

THESE

présentée

à la

FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS

(Pharmacie)

par

Victor Raul VILLANUEVA MIÑAN

SUR LA BIOGENESE

DE LA

CHAINE LATERALE EN POSITION 24

DES PHYTOSTEROLS

Soutenue le : 1er décembre 1964

Jury : MM.

M.M. JANOT

Président

E. LEDERER

Examineurs

J. POISSON

THESE

présentée

à la

FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS

(Pharmacie)

par

Victor Raul VILLANUEVA MIÑAN

SUR LA BIOGENESE
DE LA
CHAINE LATERALE EN POSITION 24
DES PHYTOSTEROLS

Soutenue le : 1er décembre 1964

Jury : MM.

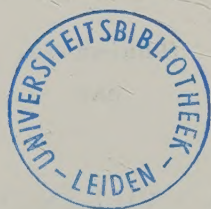
M.M. JANOT

Président

E. LEDERER

Examineurs

J. POISSON



PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE. O.  C.  Ord. Nat. du Mérite	<i>Doyen</i>
MM.	JANOT. O.  C. 	<i>Assesseur</i>
	P. MALANGEAU. O. 	<i>Assesseur</i>
	L. RODINEAU.  O. 	<i>Secrétaire Général</i>
Mme	S. FERRARI. O. 	<i>Attachée Principale</i>
	D. COUTURIER.	<i>Attachée</i>
	M. L. ESPINASSE. O. 	<i>Attachée</i>
M.	L. JEANDEL. O. 	<i>Attachée</i>
Mme	C. PEILLON.	<i>Attachée</i>
M.	A. BRENN. 	<i>Attaché</i>
Mlle	G. BIDEAU.	<i>Secrétaire</i>
Mme	S. CERTAIN. O. 	<i>Secrétaire</i>
	M. COUSIN.	<i>Secrétaire</i>
M.	A. DROUILLY. O. 	<i>Secrétaire</i>
Mlle	A. M. FAVERJON.	<i>Secrétaire</i>
Mme	L. WARNESSON. O. 	<i>Secrétaire</i>

DOYEN HONORAIRE

M.	R. FABRE. C.  C. 	<i>Membre de l'Institut</i>
----	---	-----------------------------

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	M. DELEPINE. C.  C. 	<i>Membre de l'Institut</i>
	L. LAUNOY. O.  O. 	
	P. FLEURY. O.  C. 	
	M. PICON. O.  O. 	
	C. BEDEL.  O. 	
	R. FABRE. C.  C. 	<i>Membre de l'Institut</i>

PROFESSEURS

MM.	M. M. JANOT. O. * . C . Q	Pharmacie galénique (T)
	G. VALETTE. C . * . C . Q . Ord. Nat. du Mérite	Pharmacodynamie (T)
	R. PARIS. * . C . Q	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
	M. GUILLOT. * . O . Q	Physique (T)
	J. A. GAUTIER. * . O . Q	Chimie organique (T)
Mlle	S. LAMBIN. * . O . Q	Microbiologie (T)
MM.	Y. RAOUL. * . O . Q	Physiologie (T)
	J. COURTOIS. * . O . Q	Chimie biologique (T)
	L. DOMANGE. * . C . Q	Chimie minérale (T)
	P. CRETE. * . O . Q	Botanique (T)
	R. TRUHAUT. O . * . O . Q	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
	A. MORETTE. * . O . Q	Hydrologie (T)
	R. CAVIER. O . Q	Parasitologie (T)
	A. QUEVAUVILLER. * . O . Q	Hygiène et Education Sanitaire (T)
	R. MOREAU. * . O . Q	Pharmacie chimique (T)
	A. GERMAN. O . Q	Virologie et Sérologie (T)
	M. PIETTE. * . O . Q	Biologie sanguine (T)
	P. MALANGEAU. O . Q	Chimie analytique (T)
	M. GIRARD. O . Q	Chimie appliquée à l'expertise (T)
	G. DILLEMANN.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
	G. DEYSSON. O . Q	Cytologie végétale (T)
	J. FLAHAUT. Q	Minéralogie (T)
	C. BOUDENE.	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
	J. RENAULT. O	Chimie organique (T)
	A. LE HIR.	Pharmacie galénique
	P. LARUELLE.	Physique
	P. ROSSIGNOL.	Pharmacodynamie
	A. MANGEOT. O . Q	Pharmacie galénique industrielle
	P. DELAVEAU.	Matière médicale
	Y. COHEN.	Sciences naturelles
	H. RENAULT.	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	R. BOURBON.....	Chimie analytique
	G. LE MOAN.....	Sciences appliquées
	C. PAOLETTI.....	Sciences appliquées
	P. REYNAUD.....	Sciences physico-Chimiques
	J. POISSON.....	Sciences naturelles
	A. DESVIGNES. $\odot$	Cryptogamie et technique bactériologique
	F. PERCHERON.....	Sciences appliquées
	J. SAVEL.....	Biologie animale
	J. BORY. $\odot$	Sciences naturelles
	M. MIOQUE.....	Chimie organique
	J. L. GUIGNARD.....	Botanique générale
	J. C. GOUNELLE.....	Sciences naturelles
	P. BINET.....	Biologie animale et Zoologie
	C. COMBET-FARNOUX.....	Chimie organique
Mme	M. PLAT.....	Sciences appliquées
MM.	E. DELACOUX.....	Sciences physico-Chimiques
	J. DIDRY (F.F.).....	Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

Mme	J. BLANC (F.F.).....	Chimie analyses (1re A. N)
MM.	A. CARLIER (F.F.).....	C.E.S. Pharmacie galénique Industrielle
	J. CHARLES (F.F.).....	Mathématiques
	C. DAGRON (F.F.).....	Chimie préparation (1re A. N)
Mle	M. T. DECAUDIN (F.F.).....	Biologie animale (3e A.).
M.	C. DREUX (F.F.).....	C.E.S. Electrochimie appli- quée à l'analyse
Mle	G. DUMANT (F.F.).....	Chimie préparations (1re A. N)
MM.	P. GEORGES (F.F.).....	C.E.S. Parasitologie
	P. GESTEAU. $\ast$. $\odot$. $\odot$	C.E.S. Biochimie
Mle	M. J. GOURSAT (F.F.).....	Chaire de botanique
MM.	H. GUERIN. $\ast$. $\odot$. $\odot$	Biologie végétale (3e A)
	M. GUERNET.....	Chimie (2e et 3e années)
	M. HAMON. (F.F.).....	Chimie analyses (1re A. N)
	J. HARISPE. $\odot$. $\odot$	Chimie préparations (1re A)
	G. HAZEBROUCQ (F.F.).....	Physique

M.	J. HENRY.....	Chimie (4e Année)
Mme	J. HUBERT.....	C.E.S. Bactériologie
Mme	M. J. HURON (F.F.).....	Mathématiques
Mle	Y. JUND.....	C.E.S. Microbiologie
M.	M. LEBOEUF (F.F.).....	C.E.S. Pharmacotechnie
Mme	N. LEGER (F.F.).....	Zoologie
M.	R. LELUC.....	Microbiologie (4e A)
M.	A. LEMONNIER.....	Chimie analyses (2e et 3e A)
Mme	S. LEMONTEY.....	Chimie (4e A).
Mle	M. LONGEVIALLE (F.F.).....	Chaire de botanique
Mle	S. LONGUEVALLE. () . ()	Chimie examens
MM.	J. MANDEREAU (F.F.).....	C.E.S. Pharmacotechnie
	H. MARTIN FRERE (F.F.).....	Chimie préparations (1re A)
Mle	H. MORIN. () . ()	C.E.S. Pharmacodynamie
M.	H. MOSKOWITCH, (F.F.).....	Chimie analyses (1re A N.)
Mme	M. J. NOTTEGHEN (F.F.).....	Zoologie
MM.	NGUYEN PHU LICH.....	C.E.S. Toxicologie
	M. PARIS (F.F.).....	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Biologie)
	R. PERLES.....	C.E.S. Biochimie
	J. PESTIS (F.F.).....	Biologie animale (2e A)
	P. POUILLAIN.....	C.E.S. Hématologie
	J. RIVET (F.F.).....	Chaire de Physique
Mme	M. ROBERT.....	C.E.S. Sérologie
Mle	A. ROLLEN. * . () . ()	Biologie végétale (2e A)
Mle	L. SEGUIN. () . () (F.F.)	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (physico-chimie)
Mme	M. SEILLER (F.F.).....	Pharmacie galénique industrielle
M.	J. YONGER (F.F.).....	Chimie analyses (1re A)

BIBLIOTHEQUE

Mle	Y. RUYSSSEN. * . () . ()	Conservateur, chargée de la direction
Mle	S. LAVAUD. * . () . ()	Conservateur
Mme	G. KREHMER. () . ()	Conservateur
Mme	A. DESGRIPPES. () . ()	Bibliothécaire

a

MIS PADRES

SOMMAIRE

	Pages
I. - <u>INTRODUCTION</u>	3
II. - <u>BIOSYNTHESE DES STEROLS</u>	7
Biogénèse du cholestérol	9
Origine des carbones 28 et 29	16
III. - <u>TECHNIQUES UTILISEES</u>	19
Techniques radiochimiques	21
Chromatographie	22
Spéctrométrie de masse	24
Ozonolyse	28
Techniques diverses	32
IV. - <u>EXPOSE DE NOS TRAVAUX</u>	35
1) <u>Première Partie</u> :	
Biosynthèse de la chaîne latérale éthyle du stigmastérol par les graines de <u>Soja hispida</u> ..	37
2) <u>Deuxième Partie</u> :	
Biosynthèse de la chaîne latérale éthylidène du fucostérol par l'algue brune <u>Laminaria</u> <u>saccharina</u>	49
a - Premier. essai de biosynthèse	51
b - Etude des conditions d'ozonisation du fucostérol	65
c - Deuxième essai de biosynthèse	71
V. - <u>CONCLUSION</u>	75
VI. - <u>RESUME</u>	79
VII. - <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Il y a peu de temps Lederer (1) écrivait "Jamais on n'aurait pu, sans l'emploi de substances marquées par des isotopes, suivre pas à pas le cheminement et les réactions des petites molécules, préciser leurs enchaînements, la formation de molécules de plus en plus compliquées".

En effet, l'emploi des isotopes a doté le biochimiste d'un outil incomparable pour l'étude du métabolisme des substances les plus diverses. En 1934, Hévésy eut l'idée d'utiliser des isotopes pour les études biologiques ; il constata qu'en administrant à des animaux du phosphate minéral contenant du ^{32}P le squelette devenait fortement radioactif quelques jours après ; jusque-là on pensait évidemment que le squelette, une fois formé, maintenait les molécules de phosphate de calcium liées de façon permanente pendant toute la vie de l'animal ; ces essais de Hévésy ont montré que ces molécules se renouvellent constamment ; ce renouvellement constant est un phénomène général de la matière vivante et concerne aussi bien la graisse du tissu adipeux, les protéines du muscle etc. . . Grâce aux isotopes les biochimistes ont découvert le rôle des petites molécules. Prenons comme exemple, les acides formique et acétique ; il y a trente ans encore ces composés étaient considérés comme des substances secondaires, l'une produite par la fourmi pour se défendre, l'autre produite par des bactéries acétiques "pour servir d'assaisonnement à nos salades". Maintenant, on connaît le rôle essentiel que jouent ces molécules dans la biosynthèse d'un très grand nombre de substances indispensables au fonctionnement de la cellule ; prenons de l'acide formique marqué par le ^{14}C et injectons-le à un animal ; après quelques heures seulement, nous retrouvons la radioactivité de l'acide formique dans de nombreuses substances : glycocolle, sérine, thymine, méthionine, etc. . .

Faisons la même expérience avec de l'acide acétique, marqué dans l'un de ses atomes de carbone : quelques heures après l'injection nous le retrouvons dans les acides gras, mais aussi dans le

cholestérol : cette découverte de Bloch et Rittenberg a conduit à l'étude détaillée de la biosynthèse du cholestérol et des stéroïdes et terpénoïdes en général. Elle a permis la mise en évidence du rôle important de l'acide mévalonique qui conduit au squalène. La cyclisation de ce triterpène donne le lanostérol qui est ensuite transformé en cholestérol" (1).

L'identification de stérols possédant, en plus de la configuration du cholestérol, des groupements méthyle, méthylène, éthyle ou éthylidène dans la position C-24, posa aux chercheurs le problème de l'origine de ces carbones supplémentaires.

Une fois prouvé le fait que la biosynthèse de ces phytostérols s'effectuait comme celle du cholestérol, il restait à établir l'origine du carbone 28 dans les stérols en C₂₈ et celle des carbones 28 et 29 des phytostérols en C₂₉.

L'utilisation des molécules marquées a permis de mettre en évidence le mécanisme biologique par lequel ces carbones sont introduits. On sait, d'après Alexander et Schwenk (2) et Parks (3), que le carbone 28 de l'ergostérol provient du groupe méthyle de la méthionine par transméthylation.

En ce qui concerne les stérols en C₂₉, Castle et coll. (4) ont effectué des essais d'incorporation du méthyle de la méthionine dans le β -sitostérol de *Pisum sativum* et récemment Bader, Guglielmetti et Arigoni (5) ont apporté la preuve expérimentale d'une double méthylation par la méthionine, dans le cas de la biosynthèse du spinastérol par *Menyanthes trifoliata*.

Dans une première partie de notre travail, nous avons prouvé que le groupe éthyle en 24 du stigmastérol synthétisé par les graines de *Soja hispida* Moench, provenait du groupe méthyle de la méthionine.

Aucune étude n'a encore été faite sur l'origine du groupe éthylidène des stérols en C₂₉ des algues ou de plantes supérieures.

Dans une seconde partie, nous avons apporté pour le cas du fucostérol de l'algue *Laminaria saccharina* Lamouroux, la preuve expérimentale de la biosynthèse du groupement éthylidène par double méthylation à partir de la méthionine.

Cette thèse comprend :

- 1) Un rappel des travaux concernant la biosynthèse de stérols.
- 2) Un exposé des différentes techniques utilisées.
- 3) Les résultats de nos recherches.

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette, Seine-&-Oise), dirigé par MM. les Professeurs M. -M. JANOT et E. LEDERER.

Nous sommes heureux de remercier particulièrement Monsieur le Professeur E. LEDERER, qui nous a confié ce sujet de thèse, pour l'intérêt avec lequel il a suivi nos recherches, pour les conseils qu'il nous a prodigués et pour sa constante bienveillance à notre égard. Qu'il trouve ici l'assurance de notre respect et de notre profonde affection.

Monsieur le Professeur M. -M. JANOT a bien voulu accepter la présidence de notre jury. Nous l'en remercions vivement, de même que pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour l'aide désintéressée et la compréhension qu'il nous a manifestées.

Nous remercions Monsieur le Professeur J. POISSON, qui a bien voulu faire partie de notre jury.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Monsieur M. BARBIER, Maître de Recherches au C. N. R. S. Il nous est agréable de le remercier ici, de ses conseils, de son aide constante, ainsi que de son soutien amical. Qu'il trouve en ce travail l'expression de notre attachement.

Notre gratitude va à tous ceux qui nous ont facilité notre tâche.

BIOSYNTHESE des STEROLS

BIOSYNTHESE DES STEROLS

(a) BIOGENESE DU CHOLESTEROL

A la suite de la découverte du deutérium par Urey en 1932, Schoenheimer (6) commença une série de recherches sur l'utilisation du deutérium dans l'étude du métabolisme intermédiaire. Les études sur la biosynthèse des graisses furent rapidement étendues vers l'exploration du mécanisme de biosynthèse du cholestérol.

Ainsi dans une de leurs expériences, Rittenberg et Schoenheimer (7) élevèrent des souris pendant deux mois avec de l'eau enrichie en eau lourde. Ils trouvèrent que le deutérium contenu dans le cholestérol correspondait à 50 % de la quantité de deutérium en circulation. Ce résultat indiquait qu'environ la moitié des atomes d'hydrogène-deutérium du cholestérol provenait de l'eau : le mécanisme de biosynthèse devait donc impliquer la participation d'un grand nombre de petites molécules.

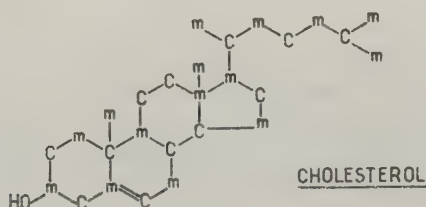
Presque en même temps Sonderhoff et Thomas (8) rapportèrent que la fraction insaponifiable obtenue d'une levure, cultivée en présence de trideutéroacétate de sodium, contenait des quantités appréciables de deutérium. Ceci montrait que l'acétate était utilisé directement dans la synthèse des stérols.

Quelques années plus tard, Bloch et Rittenberg (9) (10) démontrèrent que l'acide acétique était un précurseur du cholestérol chez les animaux et qu'il pouvait servir comme principale source de carbone pour la biosynthèse du cholestérol.

En même temps, on trouva que d'autres substances comme l'éthanol, l'acide pyruvique, l'acide acétoacétique, l'acide isovalérique et la leucine pouvaient également être utilisées. Mais on sait à présent que ces substances sont d'abord métabolisées en acétate (11). D'autres informations furent obtenues lorsque Little et Bloch (12) firent la dégradation du cholestérol, biosynthétisé à partir de l'acétate marqué. La méthode expérimentale consistait à préparer

par incubation de tissus de foie de rat en présence d'acétate radio-actif, deux échantillons de cholestérol : l'un synthétisé à partir de l'acétate $1-^{14}\text{C}$ et l'autre à partir de l'acétate $2-^{14}\text{C}$. Puis chaque échantillon fut dégradé en fragments représentant chaque atome de carbone de la molécule. Bloch et ses collaborateurs (13) établirent de cette façon l'origine du groupe isopropyle de la chaîne latérale, des groupes des méthyles angulaires et de deux atomes de carbone dans le système cyclique (14).

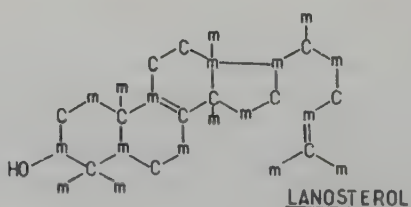
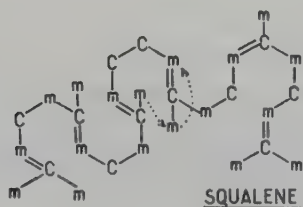
Cornforth et collaborateurs (15) (16), ainsi que Dauben et collaborateurs (17) (18) (19) identifièrent tous les atomes de carbone du cholestérol biosynthétisé à partir de l'acétate et établirent leur origine, correspondant soit au carbone des méthyles (m) soit au carbone des carboxyles (c).



La façon dont la chaîne latérale est marquée avait rappelé à Bloch une suggestion précédemment avancée par Bonner et Arreguin (20) pour la biosynthèse du caoutchouc. Ces auteurs pensaient que le caoutchouc était synthétisé à partir de l'acétate ; ceci permettait de prévoir une distribution des carbones des méthyles et des carboxyles semblable à celle trouvée dans la chaîne latérale du cholestérol.

L'existence d'une relation entre les stéroïdes et les terpènes conduisit Bloch à examiner la vieille hypothèse selon laquelle le squalène est un précurseur du cholestérol. Avec l'aide du carbone ^{14}C il n'était pas trop difficile de prouver (21) que le squalène était réellement produit à partir de l'acétate *in vivo* et que ce squalène était ensuite transformé quantitativement en cholestérol.

Bientôt après, une importante contribution vint de Woodward et Bloch (22) qui postulèrent pour le squalène un mode de cyclisation qui pouvait conduire au système tétracyclique des stérols.



Un point particulièrement intéressant était qu'un alcool triterpénique, le lanostérol, pouvait être le premier produit de la cyclisation. Il fut plus tard largement confirmé que ce mode de cyclisation était également valable pour conduire au cholestérol pourvu que les unités acétates s'associent de la manière attendue pour former le squalène. Popjak et Cornforth (23) (24) confirmèrent ces travaux en réalisant la dégradation totale du squalène biosynthétisé à partir de l'acétate - méthyle ^{14}C .

A cette même époque des travaux intensifs sur la structure du lanostérol avaient établi que ce composé en C_{30} était relié d'une part au cholestérol et d'autre part aux triterpènes en C_{30} et donc au squalène (25). Finalement le postulat biogénétique reliant le lanostérol au squalène et au cholestérol a été établi grâce à la biosynthèse du lanostérol à partir de l'acétate marqué (26), suivie de sa conversion en cholestérol in vivo à l'aide des cultures de tissus de foie de rat (27).

La transformation du lanostérol en cholestérol nécessite l'élimination de trois groupes méthyles, la réduction de la double liaison dans la chaîne latérale, et la transposition de la double liaison en 8 - 9 à la position 5 - 6. On pouvait donc envisager l'existence d'intermédiaires.

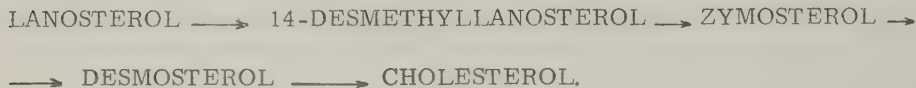
La perte des groupements méthyles a été expliquée par leur élimination sous forme de CO_2 au cours d'une réaction d'oxydation (28), (29). La transposition de la double liaison a été prouvée par Gautschi et Bloch (30), qui synthétisèrent les trois 24-dihydro-4, 4 diméthylsténols possibles et les comparèrent avec l'intermédiaire naturel qu'ils avaient isolé au cours d'une expérience de déméthylation biologique du lanostérol (29). Ils trouvèrent ainsi que l'intermédiaire correspondait au 4-4diméthyl- Δ^8 , 24-cholestadiène-3 β ol, ou 14-desméthyllanostérol.

Etant donné que le zymostérol contient aussi la double liaison du lanostérol, il était logique de le considérer comme un intermédiaire entre le 14-desméthyllanostérol et le cholestérol. Des expériences de biosynthèse (31) (32) (33) montrèrent que le zymostérol se formait à partir de l'acétate et puis se transformait en cholestérol.

Lorsque l'on donne à des animaux ou à des levures, de l'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, on observe après un temps relativement court la présence de substances beaucoup plus radioactives que le cholestérol (34 à 40). L'une de ces substances était très voisine du cholestérol et précipitait par la digitonine. Stokes, Fish et Hickey (41) (42) travaillant avec des embryons de poulet provenant d'oeufs auxquels on avait injecté de l'acétate radioactif, trouvèrent, eux aussi, que la fraction précipitée pour la digitonine, était fortement radioactive. Et ainsi en 1956 ils isolèrent à partir de ces embryons une substance qu'ils appelèrent desmostérol. Cette substance fut plus tard identifiée au 24-de-

hydrocholestérol. Elle constitue 2 % de la fraction précipitant par la digitonine et sa forte radioactivité par rapport à celle du cholestérol formé au cours de la biosynthèse, suggérait que le desmostérol était un précurseur du cholestérol, ce qui fut démontré par la transformation in vivo du desmostérol en cholestérol, par le foie de rat.

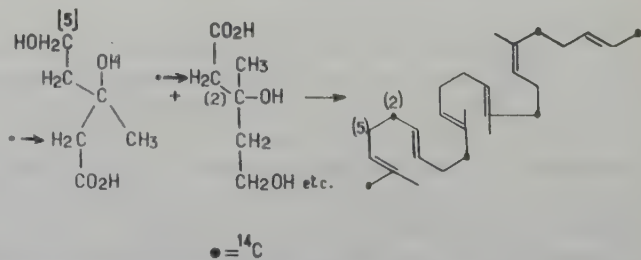
Si le desmostérol est un précurseur du cholestérol il faut admettre que la réduction de la double liaison de la chaîne latérale suit la transposition de la double liaison dans la partie cyclique. On pouvait donc jusqu'ici établir le schéma partiel suivant pour la biosynthèse du cholestérol :



Quant aux travaux concernant la recherche des intermédiaires possibles entre l'acétate et le squalène, ils se poursuivirent avec peu de succès jusqu'à 1956, époque à laquelle un groupe de chercheurs des laboratoires Merck isola l'acide mévalonique (43 à 46). Le fait que cette substance était un facteur de croissance qui pouvait remplacer l'acétate dans les milieux de cultures du *Lactobacillus acidophilus*, et que sa structure était similaire à celle de l'acide 3-hydroxy 3-méthylglutarique, connu à l'époque comme une source possible de carbone pour la biosynthèse du cholestérol (47) amenèrent Tavormina, Giffs et Huff (48) à rechercher le rôle que l'acide mévalonique pouvait avoir dans la biosynthèse du cholestérol.

Effectivement, les essais de biosynthèse avec l'acide mévalonique $2\text{-}^{14}\text{C}$ montrèrent une transformation quantitative en cholestérol. La suite de ces travaux permit de constater que le groupe carboxyle s'éliminait sous forme de CO_2 à un stade quelconque de la transformation (49). C'est à dire que l'acide mévalonique, composé en C_6 , était capable de perdre un atome de carbone pour donner un monomère en C_5 .

La conversion de l'acide mévalonique $2\text{-}^{14}\text{C}$ en squalène a été faite. Sa dégradation ultérieure par ozonolyse (50) (51) donne de l'acide lévulinique, de l'acide succinique et de l'acétone. La dégradation complète de ces substances a permis d'établir, comme prévu, qu'il y avait six positions marquées : quatre

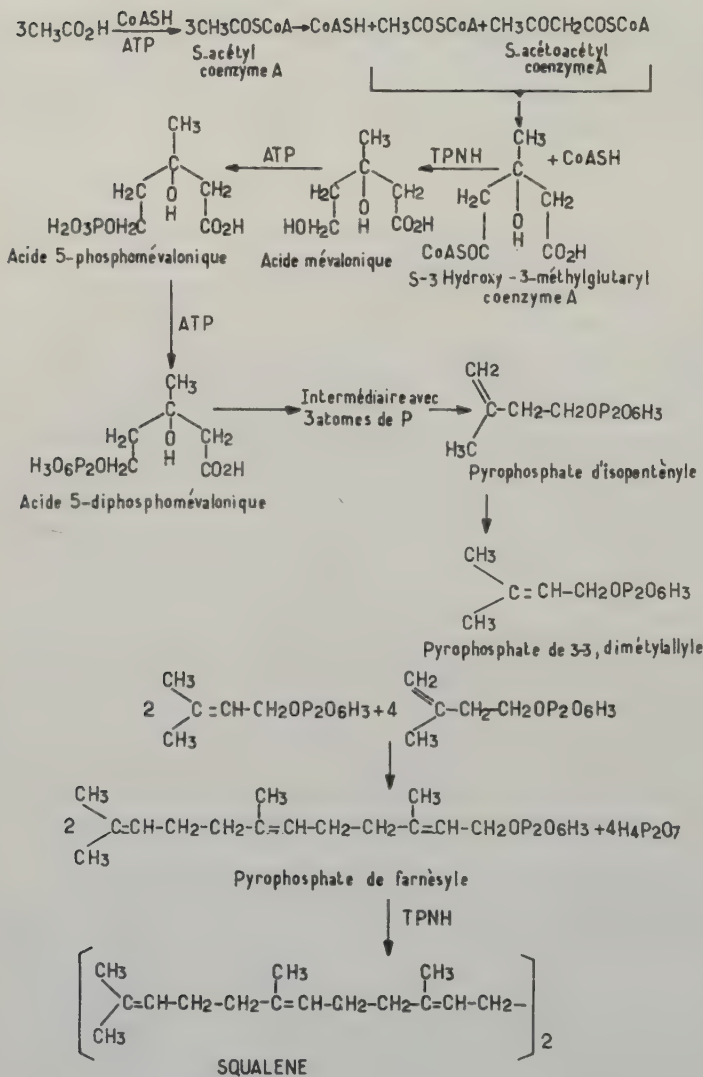


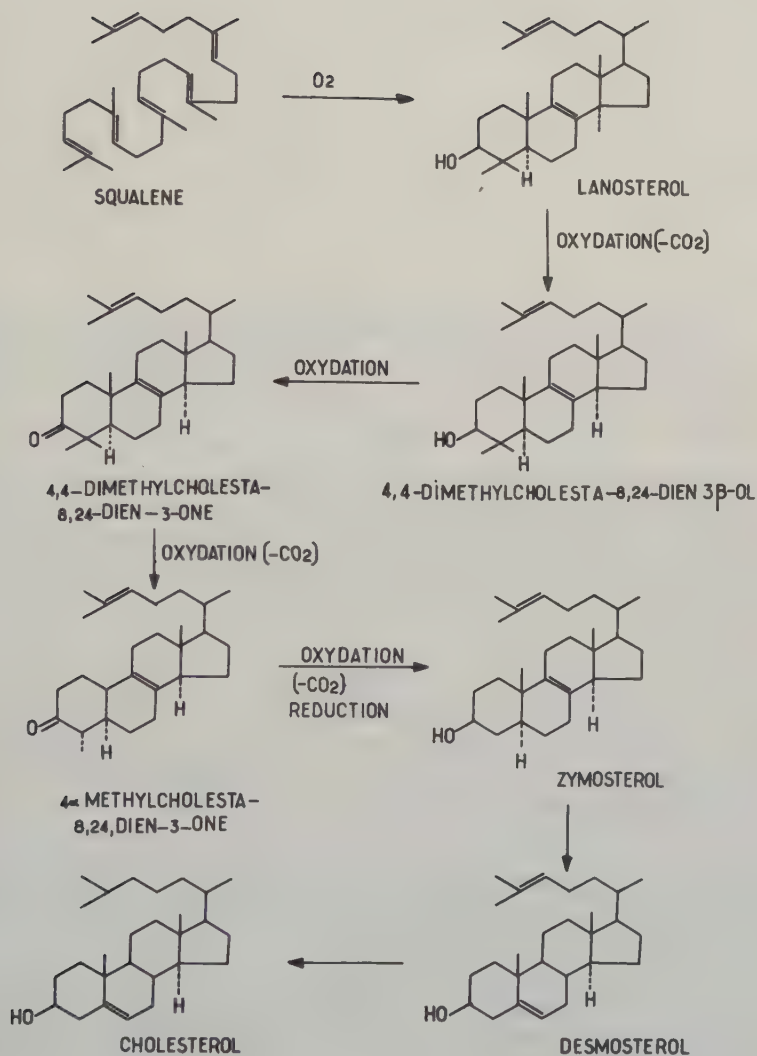
dans la chaîne et une à chaque extrémité des groupes isopropylidène. Ceci indiquait que le polymère se formait par l'union du carbone 5 de la première unité avec le carbone 2 de la seconde et ainsi de suite.

D'autre part la dégradation du cholestérol ^{14}C , obtenu par biosynthèse à partir de l'acide mévalonique 2- ^{14}C , donnait des résultats en accord avec ceux obtenus pour le squalène (52).

Les mécanismes possibles d'utilisation de l'acide mévalonique dans le processus de biosynthèse ont été publiés par Rilling, Tchen, et Bloch (53). De même les intermédiaires des passages : acétate $\rightarrow$ acide mévalonique $\rightarrow$ squalène $\rightarrow$ lanostérol $\rightarrow$ cholestérol, ont été recherchés et identifiés (54 à 73), fournissant ainsi les renseignements qui ont permis d'établir le schéma suivant pour la biosynthèse du cholestérol à partir de l'acétate :

(Voir dessin ci-après)





(b) ORIGINE DES CARBONES 28 et 29

Le schéma biogénétique du cholestérol établi, il restait encore à résoudre le problème de l'origine du carbone 28 dans l'ergostérol et autres stérols en C_{28} , et des carbones 28 et 29 dans les phytostérols en C_{29} .

On a montré récemment (74 à 79) que la biosynthèse des stérols en C_{28} et C_{29} s'effectuait essentiellement comme celle du cholestérol. Mais déjà en 1957 Danielsson et Bloch (80) réalisaient la biosynthèse de l'ergostérol à partir du formiate ^{14}C et trouvaient ainsi le premier précurseur de l'atome de carbone C-28.

Cependant, Alexander, Gold et Schwenk (81) prouvaient que la radioactivité est beaucoup mieux incorporée en remplaçant le formiate ^{14}C par la méthionine méthyl ^{14}C . Ces expériences étaient en accord avec la réaction de C-méthylation par transfert de méthyle à partir du soufre de la méthionine au cours d'une réaction biochimique, telle qu'elle avait été établie par Birch (82).

Quant aux stérols en C_{29} , Castle et coll. (4) ont effectué des essais d'incorporation du méthyle de la méthionine dans le β -sitostérol de *Pisum sativum* et ont conclu que les carbones 28 et 29 provenaient tous les deux de la méthionine.

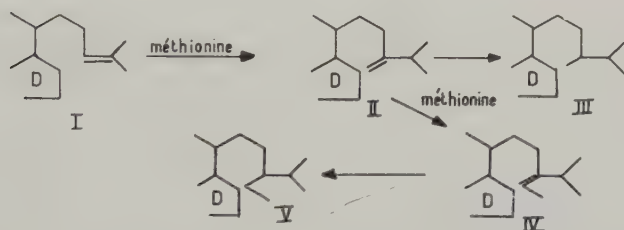
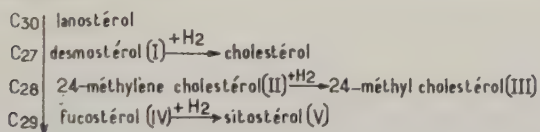
Tout récemment, Bader, Guglielmetti et Arigoni (5) ont apporté la preuve expérimentale d'une double méthylation par la méthionine, dans le cas de la biosynthèse du spinastérol par *Mentha trifoliata*.

Dans la première partie de notre travail nous démontrons également que le groupe éthyle en 24 du stigmastérol synthétisé par les graines de *Soja hispida* provient du groupe méthyle de la méthionine.

Jusqu'à ce jour, aucune étude sur l'origine des deux atomes de carbone constituant le groupe éthylidène des phytostérols en C₂₉ n'a été publiée. Ce groupe éthylidène est vraisemblablement le pré-curseur du groupe éthyle des phytostérols.

Dans la deuxième partie de ce travail nous démontrons que la biosynthèse du groupe éthylidène en 24 du fucostérol de l'algue brune *Laminaria saccharina* se fait par double méthylation par la méthionine. En effet les deux atomes de carbone 28 et 29 possèdent la même radioactivité.

Le groupe éthylidène en 24 apparaît donc comme un intermédiaire entre le groupe méthylène (du 24-méthylène cholestérol par exemple) et le groupe éthyle, en accord avec la série biosynthétique suivante (83) :



TECHNIQUES UTILISEES

TECHNIQUES UTILISEES

1) TECHNIQUES RADIOCHIMIQUES.

La découverte de la radioactivité artificielle en 1933, son application à l'étude de réactions chimiques et le grand nombre d'isotopes radioactifs dont on peut disposer, à l'heure actuelle, ont mis dans les mains de chercheurs une nouvelle méthode extrêmement sensible susceptible d'applications nombreuses (84).

Limitée initialement aux études de chimie et de physico-chimie, l'application de cette méthode s'est ensuite étendue au domaine de la biologie, où les radioisotopes sont actuellement très utilisés comme traceurs, dans la préparation des échantillons impliqués dans les processus biologiques.

La méthode générale consiste à administrer un composé radioactif à un organisme métaboliquement actif. Après un temps approprié pour en permettre l'absorption, cet organisme est sacrifié et soumis à des extractions avec des solvants adéquats. Ces extraits sont fractionnés et purifiés. La radioactivité de chacune des fractions ainsi obtenues est déterminée à chaque stade du processus de fractionnement de même que finalement la radioactivité du composé pur. La purification postérieure du produit isolé, jusqu'à radioactivité constante est nécessaire afin d'éviter de faux résultats dus aux contaminations qui pourraient, entre autre, provenir du composé radioactif de départ (85).

Après isolement et purification de la substance marquée, il faut déterminer quelle est la position de l'isotope dans la molécule. C'est à ce stade que l'on se sert de différentes méthodes de dégradations (chimique, physico-chimique, bactériologique, etc...), afin de couper la molécule et de pouvoir examiner individuellement l'activité des différents fragments (86).

Pour que les résultats obtenus puissent être interprétés correctement il est nécessaire :

1 - Que la concentration initiale du radioisotope soit suffisante afin que, malgré les dilutions qu'il subira au cours de la biosynthèse, le composé marqué isolé ait une radioactivité convenable.

2 - Que le radioisotope soit capable d'être incorporé dans la molécule ou dans une portion définie de la molécule du composé étudié.

3 - Que l'isotope ne produise pas des anomalies ou altérations du métabolisme dans l'organisme.

Les isotopes radioactifs les plus intéressants pour le biochimiste sont le ^{14}C , ^{35}S , ^3H et ^{32}P , lesquels émettent des radiations bêta. Les trois premiers possèdent une énergie de radiation si basse qu'elle est complètement absorbée par les parois des récipients qui les contiennent. Le ^{32}P possède une énergie plus élevée (87).

L'utilisation de radioisotopes nécessite des appareils qui permettent leur détection, spécialement lorsqu'il s'agit de faible radioactivité. Des progrès considérables ont été faits concernant l'appareillage. La mesure de radioactivité est fondée dans la plupart des cas sur le pouvoir ionisant ou excitant des radiations émises par les substances mesurées (88).

Dans le présent travail nous avons utilisé le ^{14}C contenu dans la L-méthionine, afin d'étudier la biosynthèse de la chafne latérale en C-24 des stérols des graines de *Soja hispida* et de l'algue brune *Laminaria saccharina*.

Les mesures de radioactivité effectuées au cours des isoléments et de la dégradation des stérols ont été faites avec un appareil de modèle C-115 de la Nuclear Chicago Corporation.

2) CHROMATOGRAPHIE.

La chromatographie est l'une des méthodes analytiques les plus employées pour la purification et séparation de substances organiques et inorganiques. Elle est particulièrement utile pour le fractionnement de mélanges très complexes, l'isolement de substances instables et la séparation de composés de structures très voisines (isomères, homologues, etc...).

Découverte par le botaniste russe Tswet, cette méthode fut, pour la première fois utilisée à l'échelle préparative par Kuhn et

Lederer (89) et subit au cours des années de nombreuses modifications (90) (91).

La séparation d'un mélange est fonction de la nature de l'isotherme, de la nature de l'adsorbant, de la vitesse de percolation, des dimensions de la colonne, de la température et de la nature des solvants.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la technique chromatographique sur colonne, sur papier et sur plaque, tant comme méthode analytique que comme méthode préparative.

A. - Chromatographie sur colonne.

Elle nous a été très utile pour la séparation du mélange constituant l'insaponifiable des fractions lipidiques des graines de *Soja hispida* et de l'algue *Laminaria saccharina*. A cet effet nous avons employé une colonne dont le matériel adsorbant était l'acide silicique Mallinckrodt et nous nous sommes toujours servi de solvants fraîchement distillés et anhydres ; les produits sont ainsi élués dans l'ordre suivant :

- éther de pétrole :	ester ou carbures saturés
- éther de pétrole/benzène :	ester ou carbures insaturés
- benzène :	carbures aromatiques
- benzène :	alcools à haut poids moléculaires, stérols
- benzène/éther :	stérols, cétones
- éther :	acides

B. - Chromatographie ascendante sur papier.

L'analyse qualitative, afin d'écarter la présence d'acide propionique dans un stade de dégradation de nos produits, a été effectuée par chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1. Le mélange de solvants employé a été le butanol saturé par le $\text{NH}_4 \text{OH}$ 1,5 N et le réactif pour révéler les acides acétique et propionique, une solution de bleu de bromothymol à pH 7,5 (92).

C. - Chromatographie sur plaque.

Introduite en 1938 par Ismailov et Schraiber (93) elle a depuis subi des développements remarquables. Les principales étapes de son évolution sont dues à Meinhard et Hall (94), Kirchner, Miller, et Keller (95), Reitsema (96), Demole (97), ainsi que Stahl (98).

La chromatographie sur plaque est une chromatographie sur couche mince d'adsorbant. Les substances ont tendance à donner des liaisons hydrogènes avec l'adsorbant ; ceci est conditionné par l'état

électronique des groupements polaires et par l'encombrement stérique de ces groupements.

La chromatographie sur plaque peut être employée comme chromatographie d'orientation (prévision de l'ordre de sortie des substances, dans une chromatographie sur colonne) ou comme chromatographie de contrôle (vérification de la pureté du produit). Nous l'avons aussi utilisée comme moyen d'isolement des 2,4-dinitrophényl hydrazones en chromatographie préparative.

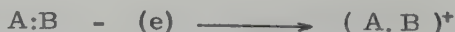
Le développement des plaques se fait dans un mélange des solvants tel que l'on ait en présence, un solvant polaire et un autre non polaire. Pour nos séparations, nous avons utilisé essentiellement des mélanges pentane-acétate d'éthyle 7:3, pentane-éther 55:45, et éther de pétrole-éther 65:45. Les R_f obtenus sur chromatoplaques, sont d'ailleurs aussi caractéristiques d'une substance que ceux obtenus sur papier.

Kirchner (95) et Stahl (96) ont décrit plusieurs adsorbants. Nous avons utilisé le mélange acide silicique-plâtre, vendu par la firme Merck sous le nom de Kieselgel G. Toutes les plaques ont été activées au four à 100° durant trois heures avant l'emploi.

3) SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse permet non seulement de déterminer la masse moléculaire d'un composé, à l'unité près, et d'en contrôler la pureté, mais elle fournit aussi de nombreuses indications sur son squelette et les groupements fonctionnels présents dans la molécule. Elle permet en plus de calculer, dans les cas d'un mélange de substances homologues, la proportion de chacun des constituants.

Une molécule A:B, à l'état de vapeur et sous pression réduite, est bombardée par un flux d'électrons d'une énergie suffisante de quelques électrons-volts pour arracher un électron :



Il en résulte l'ion $(A.B)^+$ qui est accéléré par un champ électrique et dévié par un champ magnétique. Après localisation et enregistrement, l'ion se trouve caractérisé par le rapport de sa masse (m) à sa charge (e).

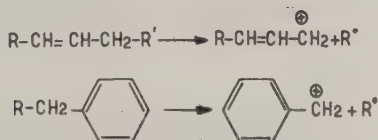
L'ion $(A.B)^+$ une fois formé, est généralement instable et se fragmente en un nouvel ion positif et un radical de rupture au niveau des liaisons les moins stables : $(A.B)^+ \longrightarrow A^+ + B.$

La fragmentation est fonction : a) de l'énergie nécessaire pour rompre une liaison ; b) de la stabilisation de l'ion⁺ et c) de la stabilisation de la charge neutre.

D'après Biemann il existe deux sortes de rupture :

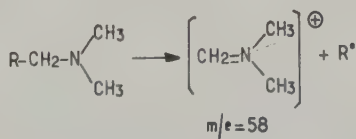
1) sans transfert d'hydrogène : - l'ion est stabilisé sans réarrangement par :

- A) - effet inductif : la rupture s'effectue, en général, au voisinage du carbone le plus substitué (un ion carbonium primaire est moins stable qu'un ion carbonium secondaire ou tertiaire).
- B) - effet mésomère : par effet des électrons π d'une double liaison ou d'un noyau aromatique, on obtient une rupture allylique ou benzylique :

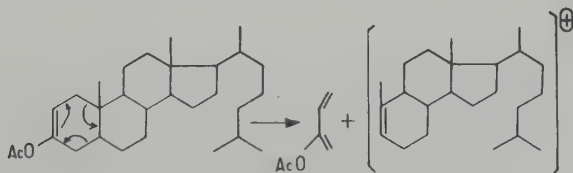


- par l'effet du doublet libre d'un hétéroatome.

Dans ce cas la rupture s'effectue en α d'un hétéroatome tels que O, N, S. Ce sont le cas des amines ou des cétones :

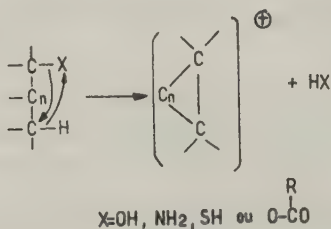


- parfois deux liaisons semblent se rompre simultanément c'est le cas d'un transfert circulaire dans un cycle hexa-atomique si la double liaison est parallèle à la jonction des cycles. On appelle cette coupure "retro Diels Alder" (99) (100).

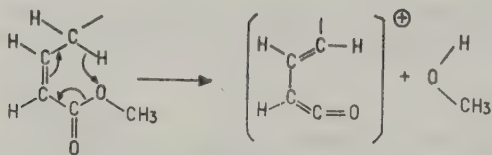


2) avec réarrangement d'un hydrogène : ces ruptures sont de trois types :

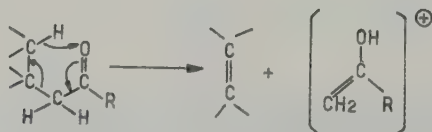
A) élimination : c'est probablement ce type de mécanisme qui provoque le départ d'eau dans les alcools.



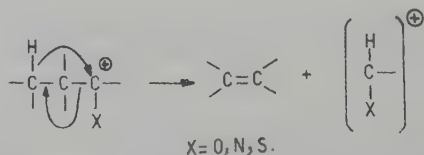
B) transfert électronique circulaire : a) induit par une double liaison carbone-carbone, comme dans le cas de la rupture d'esters $\alpha\beta$ éthyléniques :



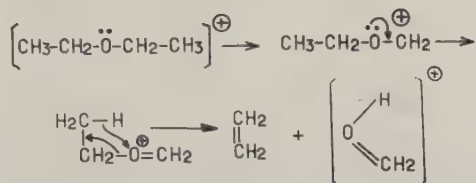
b) induit par une double liaison carbone-hétéroatome, comme dans le cas de la rupture d'esters d'acide gras :



C) transfert d'un hydrogène sur un centre positif stabilisé par un hétéroatome :



ou transfert d'un hydrogène sur un centre positif formé par une liaison carbone-hétéroatome. Ce type de rupture s'observe généralement dans les spectres d'éthers, d'amines substituées et de thioéthers :



Le réarrangement dit de Mac Lafferty, réarrangement qui joue un rôle important dans la fragmentation de certains céstéroïdes et donne des pics caractéristiques, procède lui aussi d'un tel transfert d'électrons.

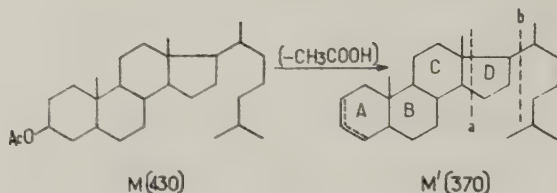
L'un des aspects les plus importants de la spectrométrie de masse est qu'elle donne une très grande information comparative-ment à la faible quantité de substance nécessaire à l'établissement d'un spectre.

La limitation essentielle de la spectrométrie de masse est le degré de volatilité et la stabilité thermique de la substance à étudier. Cependant il a été possible d'obtenir les spectres d'un grand nombre de composés de haut poids moléculaire (stéroïdes, terpènes et alcaloïdes). A cet effet l'on utilise usuellement des dérivés possédant une volatilité plus grande que le composé initial (100).

La spectrométrie de masse a été appliquée à l'analyse de substances appartenant à différentes familles chimiques (101 à 117). Dans le domaine des stéroïdes, la spectrométrie de masse a permis, d'une part la détermination de structure de la chaîne latérale et d'autre part d'indiquer la position des substituants sur le squelette (118 à 125).

L'acétate d'un stérol introduit dans le spectrographe de masse subit une série de fragmentations absolument typiques. Il y a d'abord perte d'acide acétique (M-60) avec formation d'un carbure portant une double liaison supplémentaire en 2 ou 3. Nous avons vu précédemment que dans le cas d'une double liaison en 2, il y avait possibilité d'une perte du cycle A par un réarrangement du type "retro Diels". La perte de la chaîne latérale peut se produire suivant deux schémas a et b. Ainsi la spectrométrie de masse des stéroïdes permet non seulement de connaître leur masse exacte, mais elle permet aussi de connaître la nature des substituants portés par la chaîne latérale. Par exemple l'acétate de cholestanyle (M = 430), montre un pic correspondant au cli-

vage a, à $m/e=215(M'-155)$ et un autre dû au clivage b, à $m/e=257$ ($M'-113$).



Dans notre cas la spectrométrie de masse a été particulièrement utile pour l'identification et l'estimation quantitative des différents stérols contenus dans les graines de *Soja hispida* et dans les algues *Laminaria saccharina*.

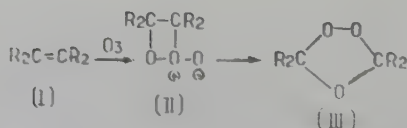
Nos mesures ont été effectuées sur un spectromètre de masse Atlas-Werke CH 4. La température de la source d'ions était de 250° et la tension utilisée était de 70 électrons-volts. Les analyses ont été effectuées sur des quantités de substances comprises entre 0, 5 et 1 mg.

4) OZONOLYSE

Aspect théorique

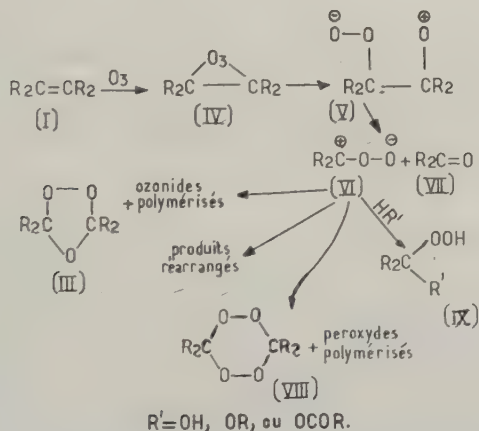
Le terme ozonolyse est employé pour désigner les réactions entre l'ozone et la double ou triple liaison d'une molécule, sans que nécessairement les produits résultants contiennent de l'oxygène. En général, le processus d'ozonolyse résulte de l'attaque par l'ozone gazeux, dilué avec l'oxygène ou l'air, de la substance non saturée en phase liquide (pure ou en solution).

Depuis le classique travail de Staudinger (126) on suppose que l'ozone réagit sur la double liaison d'une molécule I, de la substance, pour former initialement un "molozone" II instable, lequel ensuite, se réarrange pour donner un ozonide III plus stable.



Les mécanismes de ces réarrangements ont été proposés par Criegee (127), Leffler (128) et Milas (129) (130).

Criegee et coll. (131 à 135), ont fait une vaste étude sur les produits d'ozonolyse d'un grand nombre de substances insaturées dans différents types de solvants et ils ont proposé le mécanisme suivant :



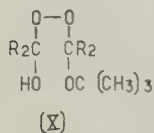
D'après Criegee le premier intermédiaire IV, dont la structure est douteuse, serait très instable et se couperait pour donner le zwitterion VI, et un aldéhyde ou cétone VII, en passant probablement par l'intermédiaire instable V. La transformation de VI dépendrait partiellement de sa structure, mais surtout de son entourage. Il y aurait au moins quatre possibilités pour la stabilisation du zwitterion (131 à 135) : a) polymérisation, b) réaction avec un solvant de type HR' c) réaction avec un aldéhyde ou cétone et d) réarrangements.

L'interaction du zwitterion avec un solvant réactif se produit généralement pour donner IX, en grande quantité, dès que la concentration du solvant présent est plus grande que n'importe quelle autre substance avec laquelle pourrait réagir le zwitterion.

Les ozonides III, et les dimères VIII, ou peroxydes polymères peuvent être trouvés comme sous-produits. Quant le solvant est inerte le zwitterion pourrait réagir avec lui même ou avec VIII. La réaction avec VII forme un ozonide monomère III comme produit principal et les ozonides polymères comme produits secondaires.

L'existence du zwitterion VI, intermédiaire clef du mécanisme d'ozonolyse donné par Criegee, a été démontrée (131) (132) (134) (136) (137).

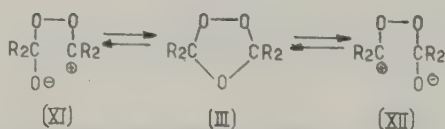
Milas (129) (130) (138), a proposé un mécanisme différent pour la réaction d'ozonolyse afin d'expliquer d'une part l'isolement de produits du type X, obtenus par l'ozonolyse de différentes oléfines dans le mélange alcool butylique tertiaire-acide sulfurique concentré, et d'autre part l'isolement de l'ozonide du tétraméthylène.



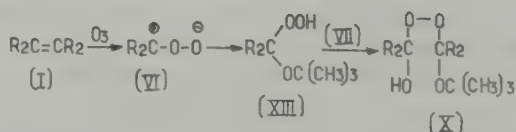
En accord avec ce mécanisme, un ozonide

(XI $\rightleftharpoons$ III $\rightleftharpoons$ XII) serait intermédiaire dans tous les processus d'ozonolyse. Les peroxydes dimères et polymères seraient produits par décomposition de XI ou XII suivi de la polymérisation du zwitterion résultant (type VI). Les composés du type X sont produits par interaction de XI ou XII avec des ions carboniums tert-butylques.

Ce mécanisme concordait avec le fait qu'aucun produit, à partir de la réaction du zwitterion de type VI avec l'ion carbonium butyl tertiaire, n'avait été isolé par ozonolyse dans le mélange alcool butylique tertiaire-acide sulfurique concentré (130).



Il est pourtant possible que le mécanisme d'ozonolyse soit différent ; dans les conditions employées par Milas et coll. (130), la formation de X est facilement compréhensible par le mécanisme de Criegee (I $\rightarrow$ VI $\rightarrow$ XIII $\rightarrow$ X) en admettant que la transformation de VI se produit plus rapidement, étant donné le milieu fortement acide ce qui favoriserait l'interaction de XIII avec VII pour produire X. :



D'ailleurs on a montré que la substance que l'on supposait être l'ozonide du tétraméthylène (130) avait un haut contenu d'oxygène actif et qu'il serait vraisemblablement un polymère du zwitterion (134).

La contribution principale de Criegee, a été de caractériser les produits actifs d'ozonolyse et le zwitterion intermédiaire condui-

sant à leur formation. Le mécanisme de Criegee, cependant n'élucide pas la nature de l'attaque initiale par l'ozone pas plus qu'elle ne trace de façon satisfaisante le chemin de la réaction entre l'attaque initiale par l'ozone et le zwitterion intermédiaire.

Des progrès considérables ont été fait dans la compréhension des réactions de l'ozone avec des substances telles que les hydrocarbures saturés, des alcools, aldéhydes, éthers, amines, phosphines, et arsines.

Ces réactions apparaissent comme appartenant à au moins deux types différents : l'un met en jeu une attaque électrophile par l'ozone et l'autre une oxydation provoquée par l'ozone dans laquelle l'oxygène est le principal réactif. Dans le dernier cas, l'ozone se comporte comme un réactif nucléophile (128) quoique ceci n'ait pas encore été démontré.

Aspect expérimental :

En général, les réactions d'ozonisation de substances organiques s'effectuent en faisant passer un courant d'oxygène contenant de 2 à 10 % d'ozone à travers une solution ou une suspension de la substance dans un milieu liquide. Dans certains cas, la substance est ajoutée à une solution d'ozone (139). Des ozonolyses en phase vapeur ont été aussi reportées (140 à 146), et des méthodes pour effectuer des réactions d'ozonisation en l'absence d'oxygène ont été développées (147) (148).

Un grand nombre de solvants a été utilisé pour dissoudre la substance à ozoniser et parmi eux nous pouvons mentionner le pentane, hexane, éther de pétrole (149) (132) (135), cyclohexane (150), benzène (151), tétrachlorure de carbone (151) (152), chloroforme (153), chlorure de méthylène (154), chlorure de méthyle (132), chlorure d'éthyle (134) (155), bromure d'éthyle (156), acétate d'éthyle (157), acétone (135), formamide (158), éther (159) (160), anhydride acétique (161), méthanol (162) (163), éthanol (164) isopropanol (165), alcool tert-butylque (130), acide formique (166) (167), acide acétique (150) (168), acide propionique (167), eau (169) et mélanges eau-acétone (170).

L'identification de peroxydes produits par l'ozonolyse, peut être faite de différentes façons, mais généralement ils sont convertis immédiatement en substances telles que, aldéhydes, cétones ou acides carboxyliques soit par réduction, oxydation, hydrolyses ou décomposition thermique.

Dans le présent travail nous avons utilisé la technique d'ozonolyse afin de dégrader la chaîne latérale des stérols stigmastérol et fucostérol.

Dans toute la série de nos essais, la source d'ozone a été fournie à partir de l'oxygène, par un appareil OZONAIR, qui donne un rendement de 6 % d'ozone. Les solvants employés pour dissoudre les stérols ont été l'acide acétique et le chloroforme.

Afin de mettre au point une méthode qui donne de bons rendements en acétaldéhyde dans l'ozonolyse du fucostérol, nous avons changé certains facteurs, dont il faut tenir compte au cours des réactions d'ozonisation : la température et la durée du temps d'ozonisation.

L'identification des produits d'ozonolyse correspondant à la chaîne latérale des stérols a été faite par leur transformation en aldéhydes volatiles. A cet effet après ozonisation on a ajouté de l'eau (dans le cas d'ozonisation dans le chloroforme, nous avons ajouté d'abord de l'acide acétique) et de la poudre de zinc, avec agitation magnétique. La disparition de l'ozonide a été suivie par réaction au papier iodo-amidoné et l'isolement des aldéhydes a été effectuée par entraînement à la vapeur d'eau. Pendant cette opération, le distillat était recueilli directement dans une solution à 0,5 % de 2,4-dinitro-phénylhydrazine dans l'acide chlorhydrique 4N, afin d'obtenir les dérivés cristallisés des aldéhydes sous la forme de leurs 2,4-dinitro-phénylhydrazones.

5) TECHNIQUES DIVERSES

A - Dosage de l'acide acétique

Les dosages d'acide acétique (obtenu par dégradation de la chaîne latérale du stigmastérol et du fucostérol) ont été effectués par une solution exactement connue, voisine de 0,2 N de NaOH, en présence de phénol phtaléine et à l'aide d'une microburette Gilmont. Les dosages ont été toujours réalisés en atmosphère d'azote et les quantités d'acide acétique déterminées par comparaison avec les titrages d'une série de solutions de concentrations connues.

B - Formation de 2,4-dinitro-phénylhydrazones

La 2,4-dinitro-phénylhydrazine, soit en solution aqueuse dans l'acide chlorhydrique, soit en solution hydroalcoolique, est un réactif caractéristique des aldéhydes et cétones (171). La réaction peut être utilisée à des fins qualitative ou quantitative. On observe la formation d'un précipité qui va du jaune au rouge.

Nous avons employé la 2,4-dinitro-phénylhydrazine en solution à 0,5 % dans l'acide chlorhydrique 4N.

C - Réaction de Liebermann-Burchard

Cette réaction (172) est caractéristique des stérols et surtout de ceux ayant un hydroxyle en 3, et une double liaison en 5. Cette réaction s'effectue en dissolvant le stérol dans le mélange chloroforme-anhydride acétique 1:1, et en ajoutant ensuite 2 à 3 gouttes d'acide sulfurique. On observe la succession des colorations du rose au vert, au cours du temps.

D - Réaction de Carr et Price

Cette réaction (173) permet la caractérisation des substances insaturées, par l'apparition d'une coloration allant du jaune au violet avec le furane, l'acide abiétique, etc. . . , bleue avec les caroténoïdes, rose violacée avec les stérols (même s'ils sont saturés). La réaction s'effectue en ajoutant à une solution chloroformique de l'une de ces substances, quelques gouttes d'une solution chloroformique de Cl_5Sb . Cette réaction nous a permis de faire des révélations de chromatoplaques de stérols. On pulvérise une solution contenant 20 g de Cl_5Sb dans 33 ml de chloroforme et l'on chauffe ensuite fortement.

E - Autres réactions

Pour les réactions de dégradation non mentionnées ici voir les pages 46 et 61.

EXPOSE de nos TRAVAUX



P R E M I E R E P A R T I E

Biosynthèse de la chaîne latérale éthyle du
stigmastérol par les graines de *Soja hispida*.

BIOSYNTHESE

DE LA CHAINE LATERALE ETHYLE

DU STIGMASTEROL PAR LES GRAINES

DE SOJA HISPIDA

Nous avons effectué un premier essai, avec le stigmastérol produit par les graines de *Soia hispida* Moench, variété jaune^{*}. Ces graines (260 g) ont été mises à germer huit jours sur une couche mince de coton humide, contenant 0,1 mc de L-méthionine méthyle ¹⁴C. Après extractions successives par l'alcool et l'éther, on a repris ces extraits par l'acétone. La fraction lipidique ainsi obtenue (23,3 g) contenait 2.097.000 c/mn.

La séparation en parties neutre et acide a été effectuée par le carbonate de sodium. La saponification de la partie neutre (17,5 g) par la potasse méthanolique a conduit à 773 mg d'insaponifiable (activité totale 101.548 c/mn).

Les stérols ont été isolés par chromatographie de cet insaponifiable sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt (élution par le benzène). Après cristallisation dans le méthanol, on obtient 88 mg de stérols, d'activité totale 87.062 c/mn. Les principaux résultats de ces extractions sont résumés dans le tableau 1.

La chromatographie sur couche mince dans le système pentane-acétate d'éthyle, 7:3 montre une tache intense après révélation par $SbCl_3$ de même R_f que le stigmastérol (On observe également une deuxième tache d'intensité plus faible que R_f 0,1 coloration rose avec $SbCl_3$).

* Nous remercions Monsieur le Professeur R. Pequinot, de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon, qui nous a fourni ces échantillons de soja.

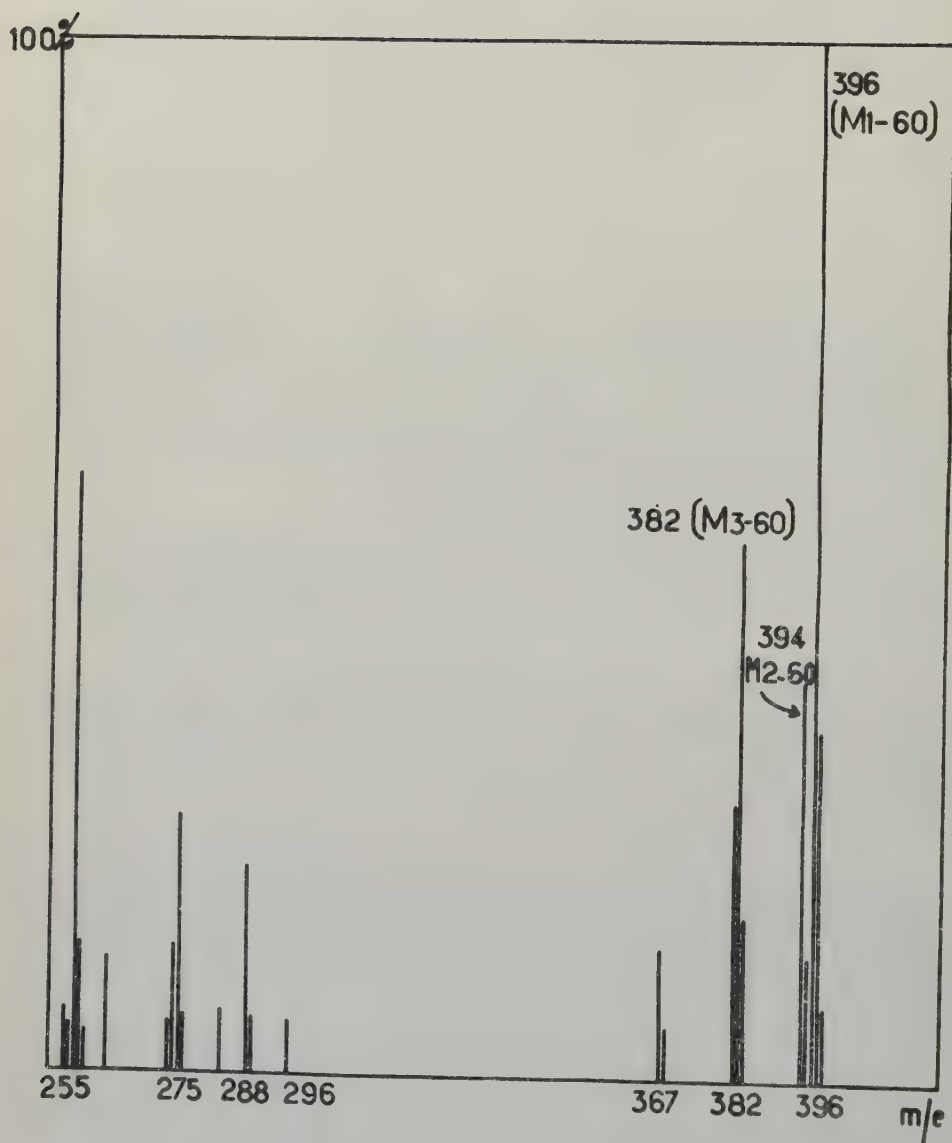


Fig. 1

Spectre de masse des acétates des stérols isolés
des graines de Soja hispida Moench.

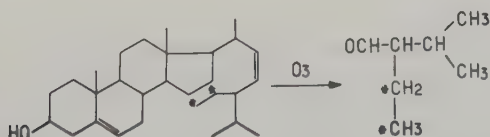
TABLEAU I.

Fractions	g	Activité totale : c/mn.
extrait total	23,3	2.097.000
neutre	17,5	1.050.000
insaponifiable	0,773	101.548
stérols cristallisés	0,088	87.062

L'étude de ces stérols a été faite par spectrométrie de masse. Ces mesures ont été effectuées sur les acétates préparés par action de l'anhydride acétique en présence de pyridine et sur les acétates hydrogénés (en présence de Pt dans l'éther).

Cette étude montre que les stérols isolés des graines de soja contiennent environ 19 % de stigmastérol. On observe aussi la présence de la série des stérols en C₂₇, C₂₈, C₂₉ déjà signalée dans divers stérols d'origine végétale (174) voir fig. 1.

La dégradation a été réalisée sur 62 mg de ce mélange de stérols. On y ajoute 16 mg de stigmastérol authentique (on peut donc évaluer à 28 mg la quantité totale de stigmastérol présent).



Partant, nous avons ozonisé pendant une heure dans l'acide acétique, à la température ambiante, puis détruit l'ozonide par additions successives d'eau et de zinc en poudre. On a ensuite entraîné à la vapeur d'eau, et séparé les dérivés carbonylés volatiles par précipitation de leurs 2,4-dinitro-phénylhydrazones. Après cristallisation dans l'éthanol, on a obtenu 13 mg de 2,4-dinitro-phénylhydrazone (soit un rendement de 70 % environ).

Après recristallisation le produit fond à 112-116°. Le point de fusion du mélange avec un échantillon de 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'aldéhyde 2-éthyl 3-méthyl butyrique authentique ne présente pas

de dépression. La chromatographie sur plaque dans le système pentane-éther 93 : 7 ne donne qu'une tache de Rf 0,29 identique au Rf de la 2,4-dinitro-phénylhydrazone authentique. L'activité totale de la 2,4-dinitro-phénylhydrazone isolée était de 11.000 c/mn. La différence observée entre l'activité de départ (56.800 c/mn) et l'activité ainsi obtenue s'explique d'une part par le rendement de l'isolement de la 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'aldéhyde 2-éthyl 3-méthyl butyrique à l'état cristallisé, et d'autre part par le fait que toute l'activité due à l'incorporation des carbones de la méthionine en C₂₄ ne se retrouve pas entièrement dans cette 2,4-dinitro-phényl-hydrazone (stérols en C₂₈ et C₂₉ possédant des chaînes latérales identiques au campesterol, et au β -sitostérol).

La 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'aldéhyde 2-éthyl 3-méthyl butyrique a été transformée en acide acétique par oxydation chromique. L'acide acétique formé a été isolé sous forme d'acétate de sodium, par titrage après entraînement à la vapeur. Cette oxydation a été faite sur 5 mg de 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'aldéhyde 2-éthyl 3-méthyl butyrique avec une activité totale de 4.300 c/mn, auxquels on a joint 5 mg du dérivé authentique. 2,8 mg d'acétate de sodium d'activité totale 4.000 c/mn, ont été récupérés par ce procédé.

Nous avons vérifié par chromatographie sur papier (92) que l'acétate isolé ne contenait pas d'acide propionique.

La faible quantité d'acétate obtenue au cours de cet essai, ne nous a pas permis de poursuivre avec succès la dégradation totale en CO₂.

L'ensemble de ces résultats prouve que le méthyle de la méthionine est bien introduit dans la chaîne latérale du stigmastérol biosynthétisé par le soja.

PARTIE EXPERIMENTALE

1° - Culture des graines de soja.

260 g de graines de soja, variété jaune, ont été mis à germer dans l'eau pendant 24 heures à 22°. On a trié les graines germées de celles restées inchangées après ce temps.

Ces graines germées ont été déposées sur une couche de coton imprégnée d'un litre d'eau contenant 0,1 mc de L-méthionine (méthyl ^{14}C), activité spécifique : 6,3 mc/mM, poids = 2,3 mg.

L'incubation a été poursuivie pendant 8 jours en chambre noire à 18°. Après cette période, les plantules avaient atteint une hauteur d'environ 10 cm.

2° - Extraction.

Les plantules ont été prélevées à la pince et broyées en présence d'éthanol. Les broyats ont été successivement extraits deux fois sur un litre d'éthanol, deux fois par un litre du mélange éthanol-éther 1:1 et trois fois par un litre d'éther. Les extraits totaux amenés à sec ont été repris par l'acétone. Nous avons de cette façon obtenu 23,3 g de lipides solubles dans l'acétone, d'activité totale : 2.097.000 c/mn.

3° - Obtention de l'insaponifiable.

Les extraits solubles dans l'acétone, ont été repris par l'éther et séparés en parties neutre et acide par le carbonate de sodium 2N. La fraction neutre, représentait 17,5 g, d'activité totale : 1.050.000 c/mn.

Elle a été saponifiée par la potasse méthanolique 3N en présence de benzène, à reflux pendant 3 heures.

Après les traitements habituels, 0,773 g d'insaponifiable d'activité totale : 101.548 c/mn, ont été obtenus.

4° - Chromatographie sur colonne.

L'insaponifiable (0,773 g) a été chromatographié sur une colonne de 50 g d'acide silicique Mallinckrodt, et nous avons élué par fractions de 50 ml de solvant.

Les fractions contenant des stérols ont été au fur et à mesure mises en évidence par la réaction de Liebermann. Les résultats de cette séparation sont reportés dans le tableau II.

TABLEAU II.

Elution No	Solvant	mg élués	Réaction de Liebermann
1	Benzène-éther de pétrole (1:1)	26,7	-
2	■ ■ ■	47,4	-
3	■ ■ ■	4,3	-
4	■ ■ (7:3)	2,5	-
5	■ ■ ■	4,2	-
6	■ ■ ■	61,3	-
7	Benzène	41,9	-
8	■	46,7	-
9	■	58,8	-
10	■	40,2	-
11	■	47,7	-
12	■	52,0	-
13	■	41,5	-
14	■	138,0	++++
15	■	51,0	+++
16	■	38,0	+
17	■	4,5	+
18	Benzène-éther (95:5)	1,5	+
19	■ ■ (9:1)	4,3	-
20	■ ■ (5:5)	5,5	-
21	Ether	0,1	-
22	Ether-méthanol (1:1)	7,0	-

- : Réaction de Liebermann négative

+ : ■ ■ faiblement positive

+++ : ■ ■ fortement positive

++++ : ■ ■ très fortement positive

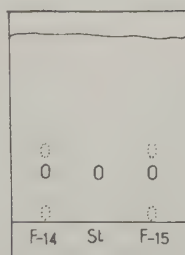
Les éluats par le benzène (tractions 14 et 15) présentaient une réaction de Liebermann fortement positive (coloration vert-bleu). Ces produits ont été cristallisés séparément dans le méthanol. Nous reportons dans le tableau III le résultat de ces cristallisations.

TABLEAU III.

Fraction 14	138 mg	1er jet = 56 mg 2e jet = 12 mg	F. 137-141° F. 128-138°	activité : 1 mg = 916 c/mn " : 1 mg = 918 c/mn
Fraction 15	51 mg	1er jet = 15 mg 2e jet = 5 mg	F. 128-138° F. 126-136°	activité : 1 mg = 1150 c/mn " : 1 mg = 1500 c/mn

5° - Analyse des stérols obtenus.

La chromatographie sur couche mince dans le système pentane-acétate d'éthyle, 7:3 (révélation par le chlorure d'antimoine) montre une tache principale de même Rf (0,29) et de même coloration (rose) que le stigmastérol. On observe aussi la présence de deux taches de plus faible intensité de Rf = 0,35 (coloration jaune) et de Rf = 0,1 (coloration rose pâle). Voir figure 2.



F-14: Fraction N°14
St : Stigmastérol
F-15: Fraction N°15

Fig. 2

L'analyse des stérols obtenus a été effectuée par spectrométrie de masse de leurs acétates, ainsi que des acétates hydrogénés. Les acétates ont été préparés par action de l'anhydride acétique, en présence de pyridine, à 37° durant 24 heures (sur 5 mg). L'acétate ainsi préparé a été utilisé directement pour les mesures. 2,5 mg de cet acétate ont été soumis à l'hydrogénation catalytique en présence de platine, et en solution dans l'éther. Cet acétate a également été utilisé directement pour la spectrométrie de masse. On observe la présence de trois pics principaux à m/e = 396, m/e = 394 et m/e = 382, correspondant à des stérols possédant des chaînes latérales contenant un groupe éthyle, un groupe éthyle et une double liaison, et un groupe méthyle. (Fig. n° 1). La mesure des hauteurs de ces pics permet d'évaluer les pourcentages des divers composés.

Les résultats de ces mesures indiquent que la fraction stéro-
lique isolée contient environ 19 % de stigmastérol.

6° - Dégradation du stigmastérol.

OZONISATION.

62 mg des stérols cristallisés, auxquels on a ajouté 16 mg de stigmastérol authentique F. 170° ont été dissous dans 15 ml d'acide acétique pur Merck. On a ozonisé pendant une heure à température ambiante, en utilisant un courant d'oxygène contenant environ 6 % d'ozone. Le courant gazeux a été lavé à la sortie de l'appareil par barbottage dans deux pièges contenant de l'acide acétique.

Les différentes solutions d'acide acétique ont été réunies et traitées alternativement par l'eau et la poudre de zinc, avec agitation magnétique. La disparition de l'ozonide a été suivie par réaction au papier iodo-amidoné. La séparation de l'aldéhyde 2-éthyl, 3-méthyl butyrique a été effectuée par entraînement à la vapeur ; pendant cette opération, le distillat était recueilli directement dans une solution à 0,5 % de 2,4-dinitro-phénylhydrazine dans l'acide chlorhydrique 4N. Cette solution a été abandonnée une nuit à 0° ; puis le précipité de 2,4-dinitro-phénylhydrazone séparé par filtration, lavé à l'eau, a été cristallisé dans l'éthanol. Nous reportons dans le tableau IV les résultats chiffrés de cette purification.

TABLEAU IV.

1re cristallisation	: 13 mg	F. 95-100°	Activité totale : 11,000 c/mn
2e cristallisation	: 8,5 mg	F. 98-104°	-----
3e cristallisation	: 5,0 mg	F. 112-116°	Activité totale : 4.300 c/mn

Le point de fusion du mélange avec la 2,4-dinitro-phénylhydrazone préparée à partir de l'aldéhyde 2-éthyl 3-méthyl butyrique (F. 114-116°) ne présente pas de dépression. Les Rf en chromatographie sur couche mince dans le système pentane-éther 93:7 sont identiques (Rf= 0,29).

OXYDATION CHROMIQUE.

5 mg de 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'aldéhyde 2-éthyl 3-méthyl butyrique avec une activité totale de 4.300 c/mn auxquels on a ajouté 5 mg du dérivé authentique ont été portés à reflux pendant six heures en présence de 10 ml du réactif de Kuhn-Roth (175) (22,3 gm de CrO₃ sont dissous dans 166 ml d'eau à 0°, puis on ajoute lentement 42 ml d'acide sulfurique). Le réfrigérant est lavé à l'eau, et l'on entraîne l'acide acétique formé par la vapeur d'eau, en suivant

au fur et à mesure par titrage à la microburette, en présence de phénolphthaléine. Les solutions ainsi neutralisées sont amenées à sec. Par ce procédé 2 mg environ d'acide acétique sont récupérés (sous forme d'acétate de sodium). Activité totale 4.000 c/mn.

Nous avons vérifié que cet acide acétique ne contenait pas d'acide propionique par chromatographie sur papier dans le système butanol-NH₄ OH (1, 5 N) en révélant par le bleu de bromothymol à pH 7, 5 (92) (voir figure 3).



1. Acétate de sodium authentique
2. Acétate obtenu
3. Propionate de sodium authentique

Fig.3

DEUXIEME PARTIE

Biosynthèse de la chaîne latérale éthylidène du fucostérol par l'algue brune *Laminaria Saccharina*.

BIOSYNTHESE DE LA CHAÎNE LATÉRALE ETHYLIDENE DU FUCOSTEROL PAR L'ALGUE LAMINARIA SACCHARINA

a) Premier essai de biosynthèse du fucostérol.

Dans une seconde partie de notre travail, nous avons étudié l'incorporation du méthyle ^{14}C de la méthionine dans la chaîne latérale du fucostérol biosynthétisé par l'algue *Laminaria saccharina* Lamouroux * .

Une douzaine d'algues a été incubée pendant sept jours dans 25 litres d'eau de mer à 15° contenant 0,1 mc de L-méthionine méthyle ^{14}C (1,6 mg). Après extraction par l'éthanol et l'éther, la fraction lipidique a été reprise par l'acétone. On a ainsi obtenu 3,5 g d'extraits totaux (activité totale : 7.343.000 c/mn). La séparation en parties neutre et acide par le carbonate de sodium a conduit à 3,0 g de partie neutre (activité totale 5.587.000 c/mn). Cette fraction neutre a été soumise à une saponification. L'insaponifiable (0,5 g) contenait une activité de 1.812.500 c/mn.

Cet insaponifiable a été chromatographié comme précédemment sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt. Les éluats réagissant par le réactif de Liebermann ont été cristallisés du méthanol.

* Nous remercions Monsieur J. Bizien, Administrateur de la Station Biologique de Roscoff de nous avoir fourni les algues, et d'avoir bien voulu nous accepter quelques jours dans ses laboratoires.



Laminaria saccharina Lamouroux

La fraction stérolique de la fraction chromatographique n° 10 a été recristallisée (voir tableau V).

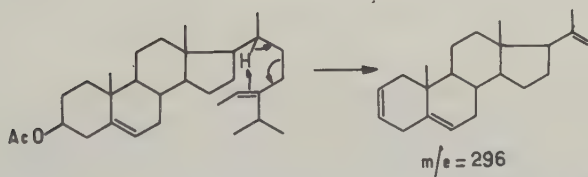
TABLEAU V.

Fractions	g	Activité totale c/mn
Extrait total acétonique	3,5	7.343.000
Neutre	3,0	5.687.000
Insaponifiable	0,5	1.812.500
Stérols bruts de la fraction chromatographique n° 10.	0,164	1.132.000

Les stérols recristallisés de la fraction n° 10 (43 mg, activité totale 301.000 c/mn) fondent à 116-120°. Le point de fusion du mélange avec un fucostérol authentique ne présente pas de dépression. La chromatographie sur couche mince dans le système pentane-acétate d'éthyle 7:3 montre une tache principale révélable par SbCl_3 et de même R_f que le fucostérol.

La spectrométrie de masse a été effectuée sur l'acétate préparé par action de l'anhydride acétique dans la pyridine à 37° et sur l'acétate hydrogéné (en présence de platine).

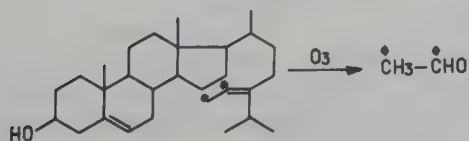
L'identification du fucostérol est facilité par l'existence du pic de l'ion à $m/e = 296$ formé par élimination de la chaîne latérale après un transfert cyclique de protons :



Le pourcentage du fucostérol a été évalué, comme dans le cas du stigmastérol, par la mesure des hauteurs des pics. Le mélange de stérols isolés contient environ 90 % de fucostérol (Fig. 4).

Il est remarquable que l'acétate de l'échantillon authentique de fucostérol présente le même spectre de masse, avec les mêmes impuretés que la fraction stérolique isolée.

La dégradation du fucostérol isolé a été effectuée comme précédemment par l'ozone. A cet effet, à 20 mg de fucostérol isolé (activité 140.000 c/mn), nous avons ajouté 40 mg de fucostérol authentique, dans l'acide acétique.



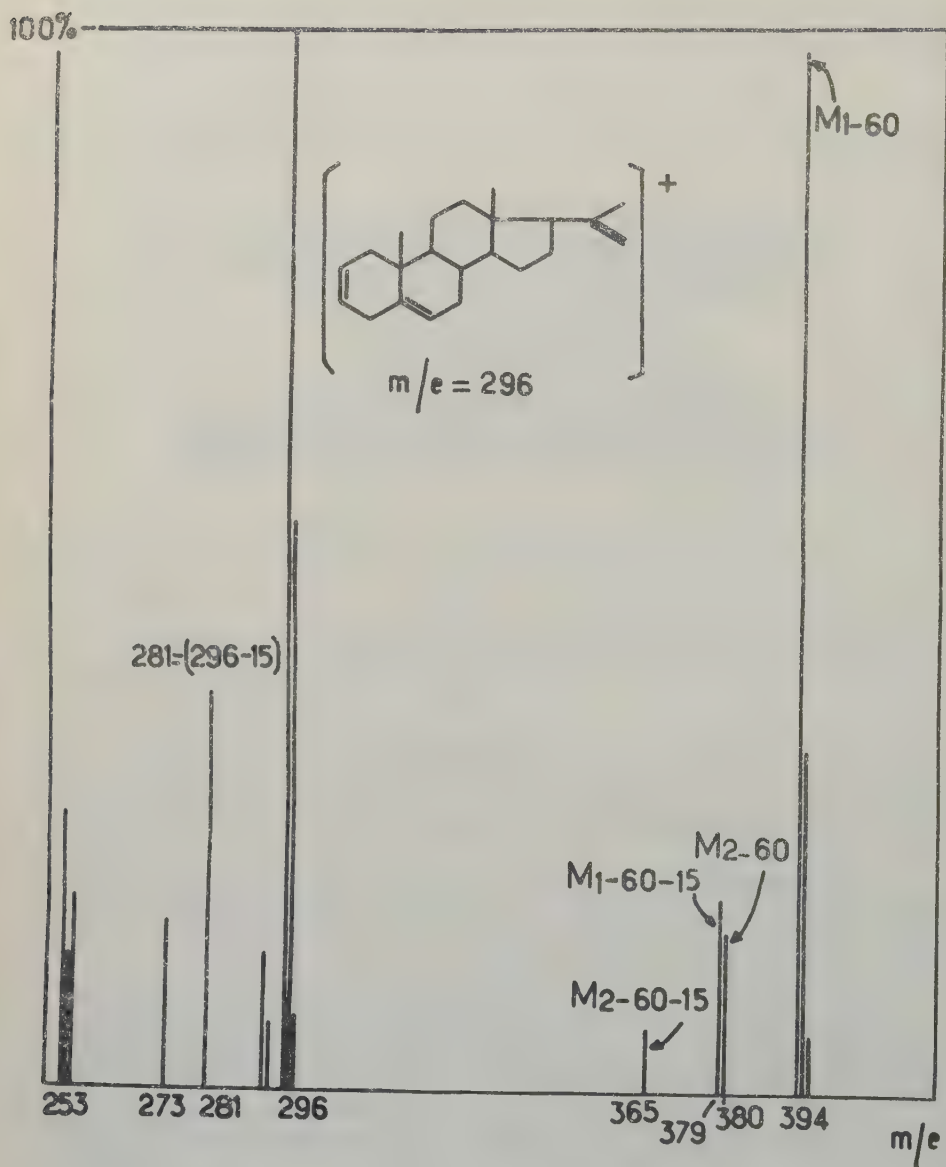
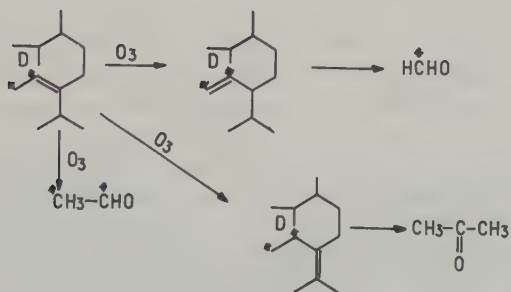


Fig. 4

Spectre de masse des acétates des stérols isolés
de l'algue *Laminaria saccharina* Lamouroux.

L'ozonide formé a été décomposé par l'eau en présence de poudre de zinc. La partie volatile a été entraînée à la vapeur d'eau et recueillie dans une solution saturée de 2,4-dinitro-phénylhydrazine dans l'acide chlorhydrique 4N. La 2,4-dinitro-phénylhydrazone obtenue (30 mg) contenait 42.000 c/mn. Par chromatographie sur couche mince dans le système pentane-éther 55:45 on a observé la présence des 2,4-dinitro-phénylhydrazones de l'acétaldéhyde, du formaldéhyde et de l'acétone, dans les proportions approximatives 3:3:4. Ce résultat s'explique par la migration de la double liaison en 24-28 lors de l'ozonisation (176).

Ces 2,4-dinitro-phénylhydrazones ont été séparées par chromatographie sur couche mince. La 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétone était totalement dépourvue d'activité. Ceci indique en particulier que le groupe $^{14}\text{CH}_3$ de la méthionine n'a pas été métabolisé en acétate, provoquant une incorporation au hasard, dans le fucostérol.



La formation de 40 % d'acétone correspond à une perte de 40 % de l'activité initiale ; de même la formation de formaldéhyde fait perdre 15 % de la radioactivité. Le précipité de 2,4-dinitro-phénylhydrazone doit, donc, contenir $30 \% + 15 \% = 45 \%$ de la radioactivité totale du fucostérol, soit 63.000 c/mn. Les 42.000 c/mn obtenus représentent 66 % de cette valeur.

L'acétate de sodium a été préparé à partir du mélange des 2,4-dinitro-phénylhydrazones, comme précédemment, par oxydation chromique suivie d'entraînement à la vapeur d'eau et titrage. A cet effet à 30 mg du mélange des 2,4-dinitro-phénylhydrazones, ont été ajoutés 30 mg de la 2,4-dinitro-phénylhydrazone authentique de l'acétaldéhyde. Nous avons obtenu 11 mg d'acide acétique (valeur déterminée par titrage). L'activité de l'acétate de sodium préparé était de 18.000 c/mn. Il est évident que durant cette opération, la 2,4-dinitro-phénylhydrazone du formaldéhyde a disparu sous forme de * CO₂ (perte de 1/3 de l'activité soit 14.000 c/mn).

L'homogénéité de cet acétate a été contrôlée par chromatographie sur papier par la même technique que précédemment.

Nous avons oxydé l'acétate de sodium selon Schmidt (177). A partir de 8 mg (12.000 c/mn) nous avons obtenu 16,4 mg de carbonate de baryum (5.100 c/mn) correspondant au carboxyle. Le carbone du méthyle a conduit à 18,8 mg de carbonate de baryum (5.400 c/mn).

L'ensemble de ces résultats apporte la preuve que le groupe-ment éthylidène en 24 du fucostérol de l'algue brune, *Laminaria saccharina* provient d'une double méthylation par la méthionine.

Ils confirment l'hypothèse de biosynthèse des phytostérols telle qu'elle a été proposée par Hügel et al. (83). Ils situent de plus, le fucostérol, de même que le 24-méthylène cholestérol, comme des intermédiaires importants entre le desmostérol et le β -sitostérol.

Cependant, il n'est pas encore possible de préciser si les méthylations de la chaîne latérale par la méthionine précèdent ou suivent la déméthylation du lanostérol, et si donc des dérivés 24-méthylène ou 24-éthylidène du lanostérol seraient plus précisément les véritables intermédiaires.

PARTIE EXPERIMENTALE

1° - Incorporation de la méthionine dans l'algue Laminaria saccharina.

Une douzaine d'algues en provenance de Roscoff a été incubée pendant sept jours dans un bac en verre contenant 25 litres d'eau de mer, additionnée de 1,6 mg de L-méthionine méthyle ^{14}C , d'activité 0,1 mc (9,05 mc/mM). La température a été maintenue à 15° par un thermostat.

2° - Extraction.

L'eau de mer radioactive a été écartée par siphonage. Les algues ont ensuite été lavées deux fois à l'eau de mer, puis coupées en petits morceaux aux ciseaux avant d'être écrasées dans un broyeur à ailettes, en présence d'éthanol à 95°. Nous avons effectué 3 extractions éthanoliques (1 litre de solvant à chaque fois) puis une extraction par le mélange alcool-éther 1:1, enfin trois extractions par l'éther. Les extraits réunis et amenés à sec, ont été repris par l'acétone. Nous avons ainsi obtenu 3,5 g de partie soluble avec une activité totale de 7.343.000 c/mn et 37 g de partie insoluble dans l'acétone. Le résidu d'algues après extraction pesait 55 g.

Les lipides solubles dans l'acétone ont été fractionnés en parties neutre et acide par le carbonate de sodium 2N ; on obtient 3 g de partie neutre (activité totale 5.687.000 c/mn).

3° - Obtention de l'insaponifiable.

La saponification par la potasse mathanolique 3N en présence de benzène pendant trois heures à reflux, conduit après les traitements habituels à 0,5 g d'insaponifiable

4° - Chromatographie sur colonne de l'insaponifiable.

L'insaponifiable (0,5 g) a été chromatographié sur une colonne de 40 g d'acide silicique Mallinckrodt. Nous avons élué par fractions de 50 ml de solvant. Au fur et à mesure des éluats la sortie des stérols a été suivie par la réaction de Liebermann. Ces résultats sont rapportés dans le tableau VI.

TABLEAU VI.

Elution N°	Solvant	mg élués	Réaction de Liebermann
1	Benzène-éther de pétrole (1:1)	63,0	-
2	" " "	71,0	-
3	" " "	37,5	-
4	" " (7:3)	32,1	-
5	" " "	40,8	-
6	" " "	15,0	-
7	Benzène	11,5	-
8	"	8,0	+++
9	"	34,4	+++
10	"	164,2	+++++
11	"	16,4	+++
12	Benzène-éther (95:5)	3,7	-
13	" " (9:1)	5,0	-
14	" " (5:5)	5,0	-
15	Ether	10,1	+++
16	Ether-méthanol (1:1)	12,5	+++
17	Méthanol	48,5	+++

- : Réaction de Liebermann négative

+++ : " " " faiblement positive

+++ : " " " fortement positive

++++ : " " " très fortement positive

* L'examen de ces fractions Liebermann positives fera l'objet d'une étude ultérieure.

Nous avons observé deux séries de produits élués donnant des réactions de Liebermann fortement positives, mais nous avons poursuivi seulement l'étude des produits de l'élution par le benzène, qui contenaient tout le fucostérol. Cette substance a été isolée à l'état cristallisé par cristallisations répétées dans le méthanol. (Voir tableau VII).

TABLEAU VII.

Fraction N°	Stérol brut	Stérol recristallisé	Point de fusion	Activité par milligramme
9	34 mg	13 mg	110-112°	4.200 c/mg
10	164 mg	43 mg	116-120°	7.000 c/mg

Dans ce qui suit, les travaux ont été effectués uniquement sur les 43 mg de stérols cristallisés provenant de la fraction n° 10.

5° - Analyse des stérols obtenus.

La fraction stérolique cristallisée montre une tache principale par chromatographie sur couche mince dans le système pentane-acétate d'éthyle, 7:3 de même Rf que le fucostérol (révélation par le $SbCl_3$). (Voir Fig. 5).

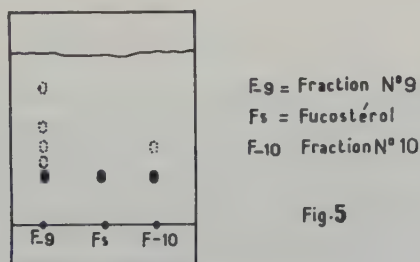


Fig.5

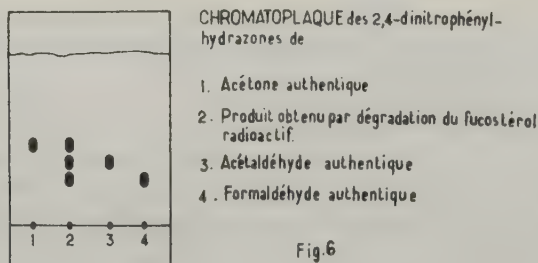
L'analyse des stérols a été effectuée par spectrométrie de masse des acétates préparés par action de l'anhydride acétique dans la pyridine (une nuit à 37°), ainsi que par la spectrométrie de masse des acétates hydrogénés en présence de platine (dans l'éther).

Les résultats obtenus indiquent que le mélange de stérols contenait environ 90 % de fucostérol (voir Fig. 4). On constate aussi la présence d'un homologue inférieur du fucostérol (24-méthylène-cholestérol ?).

6° - Dégradation du fucostérol.

20 mg du fucostérol isolé (activité totale 140.000 c/mn), additionnés de 40 mg de fucostérol authentique, ont été dissous dans 15 ml d'acide acétique pur Merck, et ozonisés à la température ambiante durant une heure. L'ozonisation, de même que les traitements ultérieurs, ont été conduits comme précédemment (voir première partie). On a obtenu 30 mg de 2, 4-dinitro-phénylhydrazone (activité totale : 42.000 c/mn).

La 2, 4-dinitro-phénylhydrazone obtenue a été étudiée par chromatographie sur couche mince dans le système pentane-éther 55:45. Trois 2, 4-dinitro-phénylhydrazones sont présentes : celle de l'acétaldéhyde ($R_f = 0,50$), celle du formaldéhyde ($R_f = 0,46$) et celle de l'acétone ($R_f = 0,57$). Voir figure 6.



Les proportions approximatives des trois constituants ont été évaluées par la comparaison de la surface des taches, et confirmée en ce qui concerne la 2, 4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétone par l'isolement par chromatographie préparative sur couche mince (ce dérivé de l'acétone était totalement dépourvu d'activité. Les proportions évaluées étaient les suivantes :

acétaldéhyde :	30 %
formaldéhyde :	30 %
acétone :	40 %

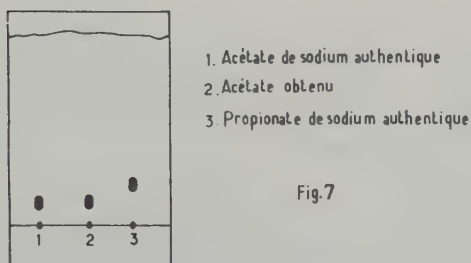
7° - Obtention de l'acétate de sodium radioactif.

L'acétate de sodium a été obtenu à partir du mélange de 2, 4-dinitro-phénylhydrazones comme précédemment (première partie) par oxydation chromique, suivie d'entraînement par la vapeur d'eau

et titrage. Cette opération a été effectuée sur 30 mg du mélange auquel on a ajouté 30 mg de la 2,4-dinitro-phénylhydrazone authentique de l'acétaldéhyde.

11 mg d'acide acétique ont été récupérés (soit 15 mg d'acétate de sodium d'activité totale : 18.000 c/mn).

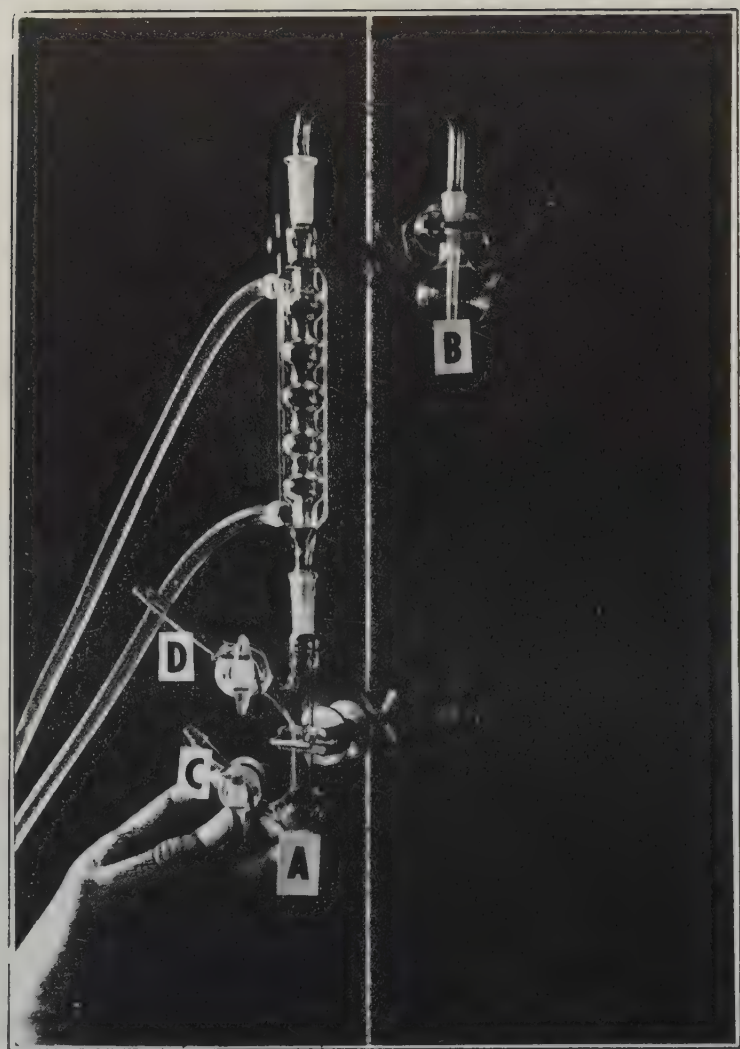
La chromatographie sur papier dans le même système que précédemment (première partie) montre que le produit ne contient pas d'autre acide que l'acide acétique (voir figure 7).



8° - Dégradation de l'acétate de sodium.

a) décarboxylation. - 8 mg d'acétate de sodium ont été introduits dans le ballon A de l'appareil (voir fig. 8), puis séchés une nuit sous vide dans un dessiccateur à potasse. Nous avons ajouté cinq gouttes d'acide sulfurique à 98 % et chauffé à 30° pour dissoudre l'acétate, puis refroidi à 15° et ajouté 10 mg d'azoture de sodium. Nous avons alors chauffé à 25° jusqu'à dissolution presque totale du sel de sodium, puis refroidi de nouveau à 15° et adapté alors le ballon au réfrigérant et le barboteur à baryte B. On fait passer quelques minutes un courant d'azote pour chasser l'air, puis on remplit le barboteur B de solution saturée de baryte juste filtrée.

Nous chauffons à 45°, toujours avec le courant d'azote puis ensuite laissons la température monter à 70°. On conserve cette température (température du bain d'huile) pendant une heure. On constate que la baryte se trouble. Le précipité de carbonate de baryum est récupéré par filtration, lavé par deux gouttes d'eau et repris directement par une goutte d'eau dans une coupelle tarée, pour mesure d'activité.



Le poids du carbonate de baryum, séché à l'aide d'une lampe à rayons infrarouge, était de 16,4 mg (activité totale : 5.100 c/mn).

b) oxydation de la méthylamine. - La dégradation de Schmidt sur l'acide acétique a fourni du gaz carbonique provenant du carboxyle, et de la méthylamine dont le groupe méthyle provient évidemment du carbone 2 de l'acide acétique. Cette méthylamine est restée dans le ballon A sous forme de sulfate.

On introduit dans le barboteur B 0,3 ml d'une solution 0,2 N d'acide sulfurique. On libère ensuite la méthylamine par addition de dix gouttes d'une solution de soude à 30 % par la tubulure latérale D sous courant d'azote, et chauffe à 90-100° pendant 20 minutes.

Après avoir nettoyé le ballon A, on y transvase la solution du barboteur B, contenant le sulfate de méthylamine. On ajoute 0,4 ml d'une solution de permanganate de potassium à 5 %, et 0,25 ml d'une solution N de soude. On fait passer quelques minutes le courant d'azote pour chasser l'air, puis on remplit le barboteur B avec la solution saturée de baryte filtrée au moment de l'emploi.

On chauffe le ballon A à 90-100° pendant 20 minutes (bain d'huile). On retire le bain d'huile quelques minutes, et on ajoute par la tubulure latérale D, cinq gouttes d'acide sulfurique concentré pur. On chauffe de nouveau à 90°-100° pendant 30 minutes. La baryte se trouble à ce moment par suite de la transformation de l'acide formique provenant de la méthylamine, en gaz carbonique.

Le carbonate de baryum formé est récupéré comme précédemment. 18,8 mg ont été obtenus (activité totale : 5.400 c/mn).

b) Etude des conditions d'ozonisation du fucostérol.

Nous avons déjà vu que l'ozonisation du fucostérol dans l'acide acétique à la température ambiante, et pendant une durée relativement longue, conduisait à la formation de formaldéhyde, d'acétaldéhyde et d'acétone.

Ce résultat nous a obligé à effectuer des approximations, pour établir la radioactivité des atomes de carbone 28 et 29 du fucostérol. Afin de rendre nos résultats plus précis, nous avons étudié ensuite les conditions pour lesquelles l'ozonisation du fucostérol conduisait uniquement à la formation de l'acétaldéhyde.

La littérature à ce sujet fournit les renseignements suivants : Heilbron, Phipers et Wright (178) avaient constaté que l'ozonisation du fucostérol ne donnait pas d'acétaldéhyde, alors que Mac Phillamy (179) traitant le stérol par l'ozone, pendant un temps plus court isolait l'acétaldéhyde avec un rendement de 30 %. Hey, Honeyman et Peal (180) confirmaient que le rendement en acétaldéhyde était fonction de la durée de l'ozonisation. Par exemple, en ozonisant 1 g de fucostérol pendant dix minutes, le rendement en acétaldéhyde atteignait 76 % (calculé sur le stérol non récupéré), cependant qu'une ozonisation de trois heures ne permettait pas d'isoler l'acétaldéhyde. Aucun des auteurs ne paraît avoir observé la formation d'acétone et de formaldéhyde, due à l'isomérisation de la double liaison. Une telle isomérisation en présence d'oxydant a pourtant été signalée (181).

Nous avons répété les ozonisations sur 30 mg de fucostérol* authentique dans l'acide acétique ainsi que dans le chloroforme en fai-

* Nous remercions Monsieur le Professeur K. Tsuda de l'Université de Tokyo, pour l'envoi de 2 g de fucostérol.

sant varier la durée de la réaction et la température. Nous reportons les résultats dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII.

Solvant	T°	Durée	2,4-dinitro-phénylhydrazones obtenues
Acide acétique	20°	60 min.	formaldéhyde acétaldéhyde, et acétone
" "	20°	10 min.	" " "
" "	10°	10 min.	formaldéhyde, acétaldéhyde
Chloroforme	0°	30 min.	acétaldéhyde, acétone
"	0°	10 min.	acétaldéhyde, petite quantité d'acétone
"	0°	1 min.	" " " "
"	- 50°	2 min. 30	acétaldéhyde

L'ozonisation du fucostérol à température ambiante dans l'acide acétique pendant une heure, a conduit comme nous l'avions observé précédemment à la formation de formaldéhyde, d'acétaldéhyde et d'acétone. Nous avons vérifié si les pourcentages de 2,4-dinitro-phénylhydrazones que nous avons évalués étaient exacts. Dans ce but, nous avons isolé ces produits par chromatographie préparative sur plaque d'acide silicique. Nous avons obtenu 40 % de dérivé de l'acétone (F. 123°-126°), 29 % de dérivé de l'acétaldéhyde (F. 144°-148°) et 31 % de dérivé de la formaldéhyde (F. 162°-165°).

Le raccourcissement de la durée de l'ozonisation dans l'acide acétique ne provoque pas de modification sensible de ce résultat. Par contre, l'abaissement de la température (10°, température limitée par le point de cristallisation du mélange) conduit à la disparition de l'acétone.

Une série d'ozonisations a donc, en conséquence, été effectuée dans le chloroforme qui permettait de travailler à température plus basse. Il ressort de ces essais que les conditions les plus favorables à l'obtention de l'acétaldéhyde, sont l'ozonisation à basse température (-50° dans le chloroforme) pendant un temps très court. Cette température très basse a pour effet de provoquer la précipitation partielle du stérol ; aussi après les deux minutes et demi du passage de l'ozone, nous avons retiré de l'appareil le ballon contenant le produit. La suspension, de couleur bleue, contenait de l'ozone en solution ; nous l'avons agitée en sortant du bain froid, jusqu'à redissolution du fucostérol (environ cinq minutes).

Après ce traitement, la 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétaldéhyde a été isolée comme précédemment, avec un rendement de 80 % (F. 144-148°). La chromatographie sur couche mince montre que la seule 2,4-dinitro-phénylhydrazone présente est celle de l'acétaldéhyde.

L'ozonisation du fucostérol, pendant un temps très court et à basse température, ne provoque donc pas la migration de la double liaison et permet d'obtenir quantitativement l'acétaldéhyde.

PARTIE EXPERIMENTALE

Dans la partie théorique (tableau VIII) nous avons résumé les différents essais d'ozonisation. Les techniques ont été les mêmes au cours de ces essais les seuls facteurs pouvant varier étant : le solvant, la température et la durée de l'ozonisation. Nous décrivons en détail dans ce qui suit deux de ces ozonisations : d'une part celle ayant permis d'évaluer les différents pourcentages de dérivés carbonylés formés dans l'acide acétique à température ambiante pendant une heure et d'autre part celle ayant conduit uniquement à la formation d'acétaldéhyde (dans le chloroforme à basse température).

1°/ Ozonisation du fucostérol dans l'acide acétique à température ambiante pendant une heure.

Cette ozonisation a été réalisée sur 30 mg de fucostérol dans 10 ml d'acide acétique Merck. à 20°. pendant une heure.

Le mélange des 2,4-dinitro-phénylhydrazones a été isolé par trois extractions à l'éther de pétrole (20 mg de produit brut).

L'ouverture de l'ozonide et l'entraînement à la vapeur des composés carbonylés volatils, ont été effectués comme précédemment

La chromatographie sur plaque dans deux systèmes (éther de pétrole-éther 65:35 et pentane-éther 55:45) montre la présence de 2,4-dinitro-phénylhydrazones de l'acétaldéhyde, formaldéhyde et acétone.

Nous avons séparé 6 mg de ce mélange par chromatographie préparative sur chromatoplaques dans le second système cité et obtenu les valeurs reportées dans le tableau IX.

TABEAU IX.

2,4-dinitro-phényl hydrazones	Rf		mg obtenus	%	Point de fusion
	éther de pétrole- éther, 65 : 35	pentane-éther, 55 : 45			
formaldéhyde	0,24	0,46	1,5	31	162°-165°
acétaldéhyde	0,27	0,50	1,4	29	144°-148°
acétone	0,36	0,57	1,9	40	123°-126°

2°/ Ozonisation de courte durée dans le chloroforme à basse température.

30 mg de fucostérol authentique, F. 123°-124° ont été dissous dans 10 ml de chloroforme fraîchement distillé sur chlorure de calcium. Nous avons refroidi à -50° par un mélange éthanol-glace carbonique. Le dégagement d'ozone a été poursuivi pendant deux minutes et demi. Après ce temps, le ballon est retiré de l'appareil. Le stérol a précipité en partie et la solution chloroformique a pris une teinte bleue, due à la présence d'ozone. On agite hors du bain froid jusqu'à redissolution du stérol (environ cinq minutes). On peut supposer que l'ozonisation continue alors, avec l'ozone dissous. La solution limpide, a perdu sa coloration bleue. On ajoute 5 ml d'acide acétique Merck, puis alternativement et par petites portions 5 ml d'eau et de la poudre de zinc. On suit la disparition de l'ozonide au papier iodoamidonné. On agite tout au long de ce traitement. Ensuite, l'acétaldéhyde formé est entraîné à la vapeur d'eau et recueilli (en même temps que le chloroforme) dans une solution de 2,4-dinitro-phénylhydrazine. On laisse en contact deux heures, puis sépare la couche chloroformique. Le surnageant aqueux est extrait deux fois par l'éther de pétrole et lavé une fois par HCl N puis une fois par l'eau. Les extraits sont séchés sur sulfate de sodium et amenés à sec.

La fraction chloroformique a donné 21 mg de produit brut et la fraction étheropétrolique 6 mg. Ces produits ont été cristallisés séparément de l'éthanol. On a obtenu 11,4 mg à partir de la partie chloroformique, F. 144°-148° et 2 mg à partir de la fraction étheropétrolique.

Ces 2,4-dinitro-phénylhydrazones, de même que les produits non cristallisés, ont été étudiés par chromatographie sur couche mince (système pentane-éther, 55:45), voir figure 9.

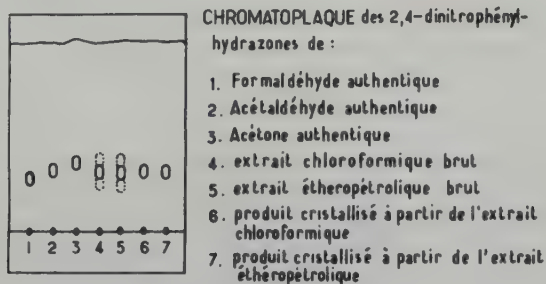


Fig. 9

c) Deuxième essai de biosynthèse du fucostérol.

Nous avons montré précédemment que la chaîne éthylidène en 24, du fucostérol synthétisé par l'algue *Laminaria saccharina*, provenait du groupe méthyle de la méthionine. Cependant, les conditions que nous avons utilisées pour la dégradation de la chaîne latérale par ozonisation n'étaient pas entièrement satisfaisantes. En effet, on observait que les 2,4-dinitro-phénylhydrazones obtenues étaient un mélange des dérivés de l'acétaldéhyde, du formaldéhyde, et de l'acétone. L'étude des conditions d'ozonisation du fucostérol a conduit à la mise au point de la technique permettant d'obtenir uniquement la 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétaldéhyde.

Dans ce qui suit, nous avons répété l'incubation de l'algue *Laminaria saccharina*, extrait de nouveau le fucostérol marqué et appliqué les résultats de nos essais d'ozonisation à sa dégradation en acétaldéhyde. L'oxydation de la 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétaldéhyde a conduit comme précédemment à deux échantillons de carbonate de baryum, correspondant aux atomes de carbone 28 et 29 et porteurs chacun d'une égale radioactivité. Ce résultat confirme le premier essai, et l'améliore en supprimant les approximations que nous avons été obligés d'introduire en conséquence de la migration de la double liaison au cours de l'ozonisation.

Une douzaine d'algues a été incubée pendant 6 jours dans 25 litres d'eau de mer, maintenue entre 15° et 20° et contenant 0,15 mc de L-méthionine ^{14}C (2,4 mg). Les extractions ont été effectuées comme précédemment. Les résultats obtenus ne sont pas absolument comparables du point de vue quantitatif. Nous pensons que ce phénomène est dû au fait que les algues du premier essai ont été récoltées en novembre, alors que celles du second essai ont été récoltées en mai. Il est connu que la production du fucostérol par les algues varie en fonction des saisons (182). Nous résumons dans le tableau 10 les résultats de ces extractions.

TABLEAU X.

Fractions	g	Activité totale c/mn.
Extrait total acétonique	4,4	5.300.000
Neutre	2,9	3.020.000
Insaponifiable	0,8	1.000.000
Stérols bruts	0,180	392.000

La fraction stérolique a été isolée comme précédemment par chromatographie de l'insaponifiable sur colonne d'acide silicique. Les stérols ont été cristallisés deux fois dans le méthanol. Nous avons ainsi obtenu 66 mg de fucostérol F. 116-121° (activité totale 190.000 c/mn).

La spectrométrie de masse des stérols isolés de *Laminaria saccharina* a montré qu'ils contenaient 90 % de fucostérol.

La chromatographie sur couche mince fournit un résultat comparable à celui que nous avons reporté au cours du premier essai.

Nous avons effectué l'ozonisation sur 30 mg de fucostérol marqué (87.000 c/mn) dans le chloroforme à -50° et isolé après entraînement à la vapeur d'eau 41,5 mg de 2,4-dinitro-phénylhydrazone brute (activité totale 54.500 c/mn).

Dans les 87.000 c/mn des 30 mg utilisés pour cet essai, 78.300 c/mn appartenaient donc au fucostérol. Comme nous avons récupéré 54.500 c/mn de la 2,4-dinitro-phénylhydrazone, le rendement est d'environ 70 %. La théorie pour 30 mg de fucostérol indique 16,4 mg de 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétaldéhyde, nous avons donc extrait avec le chloroforme une certaine quantité de réactif. Cette 2,4-dinitro-phénylhydrazone a été recristallisée de l'éthanol. Nous avons obtenu 12,5 mg de substance (activité totale 51.300 c/mn). F. 144-148°. Cette 2,4-dinitro-phénylhydrazone ne présente pas de dépression au point de fusion de mélange avec un échantillon authentique. Les R_f par chromatographie sur plaque dans les systèmes pentane-éther 55:45 et éther de pétrole-éther 65:35 sont identiques à ceux de la 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétaldéhyde authentique (on observe une seule tache).

L'acétate de sodium marqué a été isolé comme précédemment, après oxydation chromique de 7,5 mg (30.825 c/mn) de la 2,4-dinitro-phényl-hydrazone de l'acétaldéhyde, suivie d'entraînement par la vapeur d'eau et de titrage. On a obtenu 4,3 mg d'acide acétique (valeur déterminée par titrage). La radioactivité totale mesurée sur le sel de sodium (6 mg) est de 24.700 c/mn (soit un rendement voisin de 80 %).

L'oxydation de Schmidt a été faite sur 4,6 mg d'acétate de sodium (19.000 c/mn), auxquels on a ajouté 2 mg d'acétate de sodium authentique.

Le carbone du carboxyle (C₂₈) a conduit à 14,8 mg de carbonate de baryum, (activité totale 6.725 c/mn). Le carbone du méthyle (C₂₉) a conduit à 14,2 mg de carbonate de baryum (6.500 c/mn).

Ces résultats non seulement confirment nos conclusions précédentes concernant les atomes de carbone 28 et 29 du fucostérol, mais les bons rendements en radioactivité obtenus cette fois au cours des dégradations rendent totalement improbable un marquage important de la molécule de stérol ailleurs que dans le groupe éthylidène.

oooo

PARTIE EXPERIMENTALE

Toutes les étapes de ce travail ayant été menées exactement de la même façon que lors du premier essai, il ne nous a pas semblé utile d'en répéter les détails.

Les conditions de l'ozonisation du fucostérol dans le chloroforme à -50° ont déjà fait l'objet d'une description détaillée.

oOo

CONCLUSION

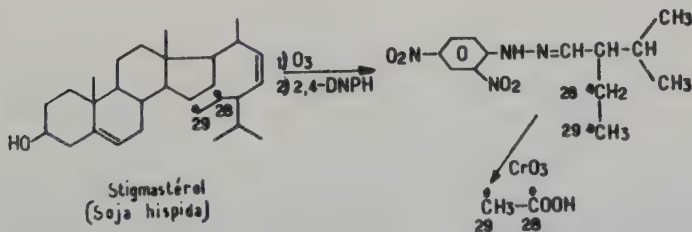
CONCLUSION

Au cours des dernières années, l'utilisation des radioéléments a permis d'établir l'origine biogénétique des carbones des stérols. Cependant, la provenance des atomes 28 et 29 des phytostérols restait inconnue et en particulier, il était certain que ces carbones ne provenaient pas du mévalonate.

Récemment, divers auteurs ont émis l'hypothèse que la chaîne éthyle des phytostérols pouvait provenir d'une double méthylation par la méthionine.

Le présent travail apporte la preuve que, dans le cas du stigmastérol biosynthétisé par la graine de *Soja hispida* Moench, de même que dans le cas du fucostérol biosynthétisé par l'algue brune *Laminaria saccharina* Lamouroux, les carbones 28 et 29 étaient introduits par la méthionine.

Nous avons fait germer les graines de *Soja hispida*, en présence de L-méthionine méthyle ^{14}C et isolé la fraction stérolique. La dégradation de la chaîne latérale a été effectuée par ozonisation. Nous avons obtenu à l'état cristallisé la 2, 4-dinitro-phénylhydrazone de l'aldéhyde 2-éthyl, 3-méthyl butyrique, puis oxydé cette substance en acide acétique par l'acide chromique.



R E S U M E

RESUME

Une hypothèse intéressante envisageait récemment la possibilité d'une introduction des atomes de carbone 28 et 29 des phytostérols par une double méthylation par la méthionine.

Dans une première partie de ce travail nous avons étudié la biosynthèse du stigmastérol de graines de *Soja hispida* Moench, afin de déterminer l'origine du groupe éthyle en 24.

Nous avons fait germer les graines de *Soja hispida* en présence de L-méthionine méthyle ^{14}C , puis isolé la fraction stérolique par chromatographie de l'insaponifiable sur colonne d'acide silicique. La chaîne latérale a été dégradée par ozonisation. La 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'aldéhyde 2-éthyl, 3-méthyl butyrique, correspondant au stigmastérol, a été oxydée par l'acide chromique, et l'acide acétique formé, isolé sous forme de sel de sodium après entraînement à la vapeur d'eau suivi de titrage. Cet acide acétique était fortement radioactif, apportant ainsi la preuve d'une méthylation en 24 par la méthionine.

Ce résultat est en accord avec des travaux précédents et montre bien que le groupe éthyle en 24 provient de la méthionine.

Dans une seconde partie nous avons étudié la biosynthèse du fucostérol par l'algue brune *Laminaria saccharina* Lamouroux. Cette algue a été cultivée en présence de L-méthionine méthyle ^{14}C . Le fucostérol isolé a été dégradé par ozonisation et l'aldéhyde obtenu sous forme de sa 2,4-dinitro-phénylhydrazone. Cet acétaldéhyde contenait presque toute la radioactivité du fucostérol. L'oxydation chromique de ce dérivé conduit à un acide acétique (isolé comme précédemment sous forme de son sel de sodium) dont la dégradation de Schmidt conduit à deux échantillons de carbonate de baryum possédant chacun environ 50 % de l'activité de l'acétate.

Ce résultat montre pour la première fois que le groupe éthyldène du fucostérol provient d'une double méthylation par la méthionine.

L'hypothèse de biosynthèse de la chaîne latérale des stérols végétaux par méthylations successives par la méthionine est donc justifiée. Le fucostérol apparaît, de même que le 24-méthylène cholestérol, comme un intermédiaire important vers la formation de la chaîne latérale éthyle.

oo0oo

Vu, le Président de Thèse :

M. -M. JANOT

Vu, le Doyen de la Faculté :

P. le Doyen

Le 1er Assesseur

M. -M. JANOT

Paris, le 26 octobre 1964.

Vu et Permis d'Imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. LEDERER,
Bull. Soc. Chim., 1963, 942.
- (2) G. J. ALEXANDER et E. SCHWENK,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 4555.
- (3) L. W. PARKS,
J. Amer. Chem. Soc., 80, 1958, 2023.
- (4) M. CASTLE, G. BLONDIN, W. R. NES.,
J. Amer. Chem. Soc., 85, 1963 ; 3306.
- (5) S. BADER, L. GUGLIELMETTI et D. ARIGONI,
Proc. Chem. Soc., 1964, 16.
- (6) R. SCHOENHEIMER et D. RITTENBERG,
J. Biol. Chem., 111, 1935, 163.
- (7) D. RITTENBERG et R. SCHOENHEIMER,
J. Biol. Chem., 121, 1937, 235.
- (8) R. SONDERHOFF et H. THOMAS,
Ann., 530, 1937, 195.
- (9) K. BLOCH et D. RITTENBERG,
J. Biol. Chem., 145, 1942, 625.
- (10) K. BLOCH et D. RITTENBERG,
J. Biol. Chem., 159, 1945, 45 ; 160, 1945, 417.
- (11) R. G. GOULD,
Revue dans R. P. Cook "Cholesterol", Academic Press, 1958.

- (12) H. N. LITTLE et K. BLOCH,
J. Biol. Chem., 183, 1950, 33.
- (13) J. WÜRSCH, R. HUANG et K. BLOCH,
J. Biol. Chem., 195, 1952, 439.
- (14) K. BLOCH,
Helv. Chim. Acta, 36, 1953, 1611.
- (15) J. W. CORNFORTH, G. D. HUNTER et G. POPJAK,
Biochem. J., 54, 1953, 590.
- (16) J. W. CORNFORTH, I. YOUHOTSKY GORE et G. POPJAK,
Biochem. J., 65, 1957, 94.
- (17) W. G. DAUBEN et K. H. TAKEMURA,
J. Amer. Chem. Soc., 75, 1953, 6302.
- (18) W. G. DAUBEN, G. J. FONKEN et G. A. BOSWELL,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 1000.
- (19) W. G. DAUBEN, T. W. HUTTON et G. A. BOSWELL,
J. Amer. Chem. Soc., 81, 1959, 403.
- (20) J. BONNER et A. ARREGUIN,
Arch. Biochem., 21, 1949, 109.
- (21) R. G. LANGDON et K. BLOCH,
J. Biol. Chem., 200, 1953, 129.
- (22) R. B. WOODWARD et K. BLOCH,
J. Amer. Chem. Soc., 75, 1953, 2023.
- (23) G. POPJAK,
Arch. Biochem., 48, 1954, 102.
- (24) J. W. CORNFORTH et G. POPJAK,
Biochem. J., 58, 1954, 403.
- (25) A. ESCHENMOSER, L. RUZICKA, O. JEGER et
D. ARIGONI,
Helv. Chim. Acta., 38, 1955, 1890.
- (26) R. B. CLAYTON et K. BLOCH,
J. Biol. Chem., 218 ; 1956, 305.
- (27) T. T. TCHEN et K. BLOCH,
J. Amer. Chem. Soc., 77, 1955, 6085.

- (28) J. A. OLSON Jr., M. LINDBERG et K. BLOCH,
J. Biol. Chem., 226, 1957, 941.
- (29) F. GAUTSCHI et K. BLOCH.,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 684.
- (30) F. GAUTSCHI et K. BLOCH,
J. Biol. Chem., 233, 1958, 1343.
- (31) E. SCHWENK, G. J. ALEXANDER, T. H. STOUTDT et
C. A. FISH,
Arch. Biochem. Biophys. 55, 1955, 274.
- (32) G. J. ALEXANDER et E. SCHWENK,
Arch. Biochem. Biophys., 66, 1957, 381.
- (33) J. D. JOHNSTON et K. BLOCH,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 1145.
- (34) E. SCHWENK et N. T. WERTHESSEN,
Arch. Biochem. Biophys., 40, 1952, 334.
- (35) E. SCHWENK et N. T. WERTHESSEN,
Arch. Biochem. Biophys., 42, 1953, 91.
- (36) E. SCHWENK et N. T. WERTHESSEN,
Amer. J. Physiol., 171, 1952, 55.
- (37) E. SCHWENK et C. F. BAKER,
Arch. Biochem. Biophys., 45, 1953, 341.
- (38) E. SCHWENK, D. TODD, et C. A. FISH,
Arch. Biochem. Biophys., 49, 1954, 187.
- (39) L. L. SMITH et N. T. WERTHESSEN,
Endocrinology, 53, 1953, 506.
- (40) S. DAYTON, E. H. MOSBACH et F. E. KENDALL,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 84, 1953, 608.
- (41) W. M. STOKES, W. A. FISH et F. C. HICKEY,
J. Biol. Chem., 200, 1953, 683.
- (42) W. M. STOKES, W. A. FISH et F. C. HICKEY,
J. Biol. Chem., 220, 1956, 415.
- (43) H. R. SKEGGS, L. D. WRIGHT, E. L. CRESSON,
G. D. E. Mac RAE, C. H. HOFFMAN, D. E. WOLF,
et K. FOLKERS,
J. Bacteriology, 72, 1956, 519.

- (44) L. D. WRIGHT, E. L. CRESSON, H. R. SKEGGS,
G. D. E. Mac RAE, C. H. HOFFMAN, D. E. WOLF, et
K. I. FOLKERS.
J. Amer. Chem. Soc., 78, 1956, 5273.
- (45) D. E. WOLF, C. H. HOFFMAN, P. E. ALDRICH, H. R. SKEGGS,
L. D. WRIGHT et K. FOLKERS,
J. Amer. Chem. Soc., 78, 1956, 4499.
- (46) D. E. WOLF, C. H. HOFFMAN, P. E. ALDRICH, H. R. SKEGGS,
L. D. WRIGHT et K. FOLKERS,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 1486.
- (47) K. BLOCH, L. C. CLARK et I. HARARY,
J. Biol. Chem., 211, 1954, 687.
- (48) P. A. TAVORMINA, M. H. GIBBS et J. W. HUFF,
J. Amer. Chem. Soc., 78, 1956, 4498.
- (49) P. A. TAVORMINA et M. H. GIBBS, ,
J. Amer. Chem. Soc., 78, 1956, 6210.
- (50) J. W. CORNFORTH, R. H. CORNFORTH, G. POPJAK et
I. Y. GORE,
Biochem. J., 69, 1958, 148.
- (51) F. DITURI, S. GURIN et J. L. RABINOWITZ,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 2650.
- (52) O. ISLER, R. RÜEGG, J. WÜRSCH, K. F. GEY et
A. PLETSCHER,
Helv. Chim. Acta, 40, 1957, 2369.
- (53) H. RILLING, T. T. TCHEN et K. BLOCH,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 44, 1958, 167.
- (54) J. J. FERGUSON Jr., et H. RUDNEY,
Federation Proc., 16, 1957, 771.
- (55) J. W. CORNFORTH, R. H. CORNFORTH, A. PELTER,
M. G. HORNING, et G. POPJAK.,
Proc. Chem. Soc., 1958, 112.
- (56) L. A. WITTING, H. J. KNAUSS, et J. W. PORTER,
Federation Proc., 18, 1959, 353.
- (57) J. J. FERGUSON Jr., et H. RUDNEY,
J. Biol. Chem., 234, 1959, 1072.

- (58) H. RUDNEY, dans G. E. W. WOLSTENHOLME et M. O'CONNOR, eds. , Ciba Foundation Symposium on the biosynthesis of terpenes and sterols, Churchill, London, 1959, p. 75.
- (59) H. RUDNEY et J. J. FERGUSON Jr. ,
J. Biol. Chem. 234, 1959, 1076.
- (60) F. LYNEN, U. HENNING, C. BUBLITZ, B. SORBO et L. KRÖPLIN-RUEFF,
Biochem. Z., 330, 1958, 269.
- (61) M. J. COON, F. P. KUPIECKI, E. E. DEKKER, M. J. SCHLESINGER, et A. DEL CAMPILLO, dans G. E. W. WOLSTENHOLME et M. O'CONNOR eds. Ciba Foundation Symposium on the biosynthesis of terpenes and sterols, Churchill, London, 1959, p. 62.
- (62) K. BLOCH, dans S. FRAFF Ed.
Essays in Biochemistry, Wiley, N. Y. , 1956, p. 22.
- (63) I. F. DURR, H. RUDNEY, et J. J. FERGUSON Jr. ,
Federation Proc. , 18, 1959, 219.
- (64) J. J. FERGUSON Jr. , I. F. DURR, et H. RUDNEY,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. , 45, 1959, 499.
- (65) F. LYNEN, J. KNAPPE, H. EGGERER, U. HENNING, et B. W. AGRANOFF,
Federation Proc. , 18, 1959, 278.
- (66) M. J. SCHLESINGER,
Federation Proc. , 18, 1959, 317.
- (67) R. M. BURTON, et E. R. STADTMAN,
J. Biol. Chem. , 202, 1953, 873.
- (68) T. T. TCHEN,
J. Biol. Chem. , 233, 1958, 1100.
- (69) G. POPJAK, L. GOSSELIN, I. Y. GORE, et R. G. GOULD,
Biochem. J. , 69, 1958, 238.
- (70) K. FOLKERS, C. H. SHUNK, B. O. LINN, F. M. ROBINSON, P. E. WITTEICH, J. W. HUFF, J. L. GILFILLAN, et H. R. SKEGGS dans G. E. W. WOLSTENHOLME, et M. O'CONNOR, eds. , Ciba Foundation Symposium on the biosynthesis of terpenes and sterols, Churchill, London, 1959, p. 20.

- (71) H. R. LEVY et G. POPJAK,
Biochem. J., 75, 1960, 417.
- (72) J. W. CORNFORTH,
Revs. Pure and Appl. Chem. (Australie), 4, 1955, 275.
- (73) J. W. CORNFORTH,
J. Lipid. Res., 1, 1959, 3.
- (74) R. D. BENNETT, E. HEFTMANN, A. E. PURCELL et
J. BONNER.
Science, 134, 1961, 671.
- (75) H. J. NICHOLAS,
J. Biol. Chem., 237, 1962, 1476.
- (76) D. J. BAISTED, E. CAPSTACK Jr. et W. R. NES,
Biochemistry, 1, 1962, 537
- (77) E. G. GROS et E. LEETE,
Chem. and Ind., 1963, 698.
- (78) D. F. JOHNSON, E. HEFTMANN et G. V. C. HOUGHLAND,
Arch. Biochem. Biophys., 104, 1964, 102.
- (79) A. R. BATTERSBY et C. F. PARRY,
Tetrahedron Letters, 1964, 787.
- (80) H. DANIELSSON et K. BLOCH,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 500.
- (81) G. J. ALEXANDER, A. M. GOLD et E. SCHWENK.,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 2967.
- (82) A. J. BIRCH,
Progr. Chem. Org. Nat. Products, 14, 1957, 186.
- (83) M. F. HÜGEL, W. VETTER, H. AUDIER, M. BARBIER,
E. LEDERER,
Phytochemistry, 3, 1964, 7.
- (84) Isotopes an eight year summary of distribution and utilisation with bibliography, mars 1955, U. S. Atomic Energy Comm., Washington, D/C.
- (85) M. D. KAMEN,
Isotopic tracers in biology, 1957, p. 133,
Academic Press, N. Y.

- (86) S. ARONOFF,
Techniques of radiobiochemistry, 1960, The Iowa
State University Press, Ames, Iowa.
- (87) J. C. BOURSNEILL,
Safety techniques for radioactive tracers, 1958,
p. 2, Cambridge University Press.
- (88) E. BRODA,
Radioactive isotopes in biochemistry, 1960, Elsevier
Publish Co., N. Y.
- (89) R. KUHN et E. LEDERER,
Zerlegung des Carotins in serie Komponenten,
Ber. 64, 1931, 1, 349.
- (90) T. REICHSTEIN et J. VON EUW,
Helv. Chem. Acta, 21, 1938, 1197.
- (91) A. TISELIUS,
Arkiv. Kemi. Mineral Geol., 15, N° 6, 1941.
- (92) F. BROWN et L. P. HALL,
Nature, 166, 1950, 66.
- (93) N. A. ISMAILOV et M. S. SCHRAIBER,
Farmatsiya N° 3, 1938, 1. ; C. Abs., 34, 1940, 855 (9).
- (94) J. E. MEINHARD et N. F. HALL,
Anal. Chem., 21, 1949, 185.
- (95) J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER, et G. J. KELLER.,
Anal. Chem., 23, 1951, 420.
- (96) R. H. REITSEMA,
Anal. Chem., 26, 1954, 960.
- (97) E. DEMOLE,
C. R. Acad. Sci., 243, 1956, 1883.
- (98) E. STAHL, G. SHROTER, G. KRAFT et R. RENZ,
Die Pharmazie, 11, 1956, 633.
- (99) R. I. REED,
J. Chem. Soc., 3, 1958, 432.
- (100) K. BIEMANN,
Mass spectrometry, 1962, Mc GRAW-HILL
Book Co., N. Y.

- (101) Catalog of mass spectra data, American petroleum institute res., projet n° 44, Carnegie institute of technology, Pittsburg, Penn.
- (102) R. A. FRIEDEL, J. L. SHULTZ, et A. G. SHARKEY,
Anal. Chem., 23, 1951, 1735.
- (103) F. W. Mc LAFFERTY,
Anal. Chem., 29, 1957, 1782.
- (104) E. G. BLOOM, F. L. MOHLER, J. H. TENGEL et C. E. WISE,
J. Res. Nat. Bur. Standards, 41, 1948, 129.
- (105) P. N. RYLANDER, S. MEYERSON et H. M. GRUBB,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 842.
- (106) V. A. YARBOROUGH,
Anal. Chem., 25, 1953, 1914.
- (107) R. A. BROWN, W. S. YOUNG, et N. NICOLAIDES,
Anal. Chem., 26, 1954, 1653.
- (108) A. G. SHARKEY, J. L. SHULTZ et E. R. FRIEDEL,
Anal. Chem., 28, 1956, 934.
- (109) J. A. GILPIN et F. W. Mc LAFFERTY,
Anal. Chem., 29, 1957, 990.
- (110) G. P. HAPP, et D. W. STEWARD,
J. Amer. Chem. Soc., 74, 1952, 4404.
- (111) R. S. GOHLKE, et F. W. Mc LAFFERTY,
4e. Annual Meeting, ASTM Committee E-14,
San Francisco, Calif., 1955.
- (112) A. G. SHARKEY, J. L. SHULTZ, et R. A. FRIEDEL,
Anal. Chem., 31, 1959, 87.
- (113) J. ASSELINEAU, R. RYHAGE, et E. STENHAGEN,
Acta Chem. Scand., 11, 1957, 196.
- (114) F. W. Mc LAFFERTY,
4e. Annual Meeting, ASTM Committee E-14,
Cincinnati, Ohio, 1956. Anal. Chem., 34, 1962, 26.
- (115) E. J. LEVY, et W. A. Stahl,
5e. Annual Meeting, ASTM Committee E-14, N. Y., 1957.
- (116) M. M. JANOT,
Pure and Appl. Chem., 6, 1963, 635.

- (117) C. DJERASSI,
Pure and Appl. Chem., 6, 1963, 565.
- (118) P. de MAYO et R. I. REED,
Chem. Ind., 1956, 1481.
- (119) R. RYHAGE et E. STENHAGEN,
J. Lipid. Res., 1, 1960, 361.
- (120) H. BUDZIKIEWICZ et C. DJERASSI,
J. Amer. Chem. Soc., 83, 1961, 1430.
- (121) C. DJERASSI, J. M. WILSON, H. BUDZIKIEWICZ, et
J. W. CHAMBERLIN,
J. Amer. Chem. Soc., 84, 1962, 4544.
- (122) D. H. WILLIAMS, J. M. WILSON, H. BUDZIKIEWICZ, et
C. DJERASSI,
J. Amer. Chem. Soc., 85, 1963, 2091.
- (123) M. DURAZO
Contribution à la spectrométrie de masse des stéroïdes,
Thèse, Paris, 1963.
- (124) W. VETTER, P. LONGEVIALLE, F. KHUONG-HUU-LAINE,
Q. KHUONG-HUU et R. GOUTAREL,
Bull. Soc. Chim., 1963, 1324.
- (125) R. GOUTAREL,
Les alcaloïdes stéroïdiques des Apocynacées, Hermann
édit., 1964.
- (126) H. STAUDINGER,
Ber., 58, 1925, 1088.
- (127) R. CRIEGEE,
Ann., 560, 1948, 131.
- (128) J. E. LEFFLER,
Chem. Revs., 45, 1949, 399.
- (129) N. A. MILAS,
dans "The chemistry of petroleum hydrocarbons",
eds. B. T. Brooks, S. S. Kurtz Jr., C. E. Boord et
L. Schmerling, Vol. 11, 1955, 399, Reinhold Publ.
Co, N. Y.
- (130) N. A. MILAS, P. DAVIS, et J. T. NOLAN Jr.,
J. Amer. Chem. Soc., 77, 1955, 2536.

- (131) R. CRIEGEE,
Record Chem. Progress, 18, 1957, 111.
- (132) R. CRIEGEE, G. BLUST, et H. ZINKE,
Chem. Ber., 87, 1954, 766.
- (133) R. CRIEGEE, A. KERCKOW, et H. ZINKE,
Chem. Ber., 88, 1955, 1878.
- (134) R. CRIEGEE, et G. LOHAUS,
Ann., 583, 1953, 6.
- (135) R. CRIEGEE, et G. WENNER,
Ann., 564, 1949, 9.
- (136) G. LOHAUS,
Chem. Ber., 87, 1954, 1708.
- (137) S. M. GOODWIN, N. M. JOHNSON, et B. WITKOP,
J. Amer. Chem. Soc., 75, 1953, 4273.
- (138) N. A. MILAS, et J. T. NOLAN Jr.,
Rapport présenté à la conférence internationale
d'ozone, Novembre (28-30), 1956, Chicago,
Illinois.
- (139) I. C. WELLS, W. H. ELLIOTT, S. A. THAYER, et
E. A. DOISY,
J. Biol. Chem., 196, 1952, 321.
- (140) E. BRINER, et R. MEIER,
Helv. Chim. Acta, 12, 1929, 529.
- (141) E. BRINER, et P. SCHNORF,
Helv. Chim. Acta, 12, 1929, 154.
- (142) E. BRINER, et P. SCHNORF,
Helv. Chim. Acta, 12, 1929, 181.
- (143) R. D. CADLE, et C. SCHADT,
J. Amer. Chem. Soc., 74, 1952, 6002.
- (144) R. D. CASTLE, et C. SCHADT,
J. Chem. Phys., 21, 1953, 163.
- (145) R. H. EASTMAN, et R. M. SILVERSTEIN,
J. Amer. Chem. Soc., 75, 1953, 1493.

- (146) C. C. SPENCER, W. I. WEAVER, E. A. OBERRIGHT,
H. J. SYKES, A. L. BARNEY, et A. L. ELDER,
J. Org. Chem., 5, 1940, 610.
- (147) H. P. BROIDA, et R. P. PELLAM,
J. Chem. Phys., 23, 1955, 409.
- (148) C. E. THORP,
Bibliography of ozone technology, Vol. 11, 1955,
Armour research foundation of Illinois institute of
technology, Chicago, Illinois.
- (149) P. S. BAILEY, et F. J. GARCIA-SHARP,
J. Org. Chem., 22, 1957, 1008.
- (150) P. S. BAILEY,
Chem. Ber., 87, 1954, 993.
- (151) C. S. MARVEL, et V. NICHOLS
J. Org. Chem., 6, 1941, 296.
- (152) R. CRIEGEE, P. de BRUYN, et G. LOHAUS,
Ann., 583, 1953, 19.
- (153) J. P. WIBAUT, et H. BOER,
Rec. trav. Chim., 74, 1955, 241.
- (154) D. H. R. BARTON, et E. SEONE,
J. Chem. Soc., 1956, 4150.
- (155) B. RINIKER, D. ARIGONI, et O. JEGER,
Helv. Chim. Acta, 37, 1954, 546.
- (156) L. I. SMITH, et E. R. ROGIER,
J. Amer. Chem. Soc., 73, 1951, 3831.
- (157) B. WITKOP, et J. B. PATRICK,
J. Amer. Chem. Soc., 74, 1952, 3855.
- (158) B. WITKOP,
Ann., 556, 1944, 103.
- (159) F. KAWAMURA,
Bull. Chem. Soc. Japan, 16, 1941, 382.
C. Abs., 41, 1947, 4463.
- (160) H. KAWAMURA,
J. Chem. Soc. Japan, 62, 1941, 259.
C. Abs., 37, 1943, 4372.
- (161) I. M. ROITT, et W. A. WATERS,
J. Chem. Soc., 1949, 3060.

- (162) P. S. BAILEY, .
J. Amer. Chem. Soc., 78, 1956, 3811.
- (163) P. S. BAILEY,
J. Org. Chem., 22, 1957, 1548.
- (164) J. L. WARNELL, et R. L. SHRINER,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1957, 3165.
- (165) E. I. DUPONT de NEMOURS et Co.,
British patent 713, Août 1954, 344.
- (166) R. M. DORLAND, et H. HIBBERT,
Can. J. Research., 18 B, 1940, 30.
- (167) I. G. LANGMAN, A. F. Mc KAY, et G. F. WRIGHT,
J. Org. Chem., 14, 1949, 550.
- (168) P. S. BAILEY,
Chem. Ber., 88, 1955, 795.
- (169) R. NAKAMORI,
J. Pharm. Soc. Japan, 76, 1956, 275.
C. Abs., 50, 1956, 13866.
- (170) R. CRIEGEE, et G. LOHAUS,
Ann., 583, 1953, 12.
- (171) N. D. CHERONIS, et J. B. ENTRIKIN,
Semimicroqualitative Analyse, 1957, 493,
Interscience Publ., N. Y.
- (172) M. JAVILLIER,
Traité de Chimie Organique de Grignard, 16, 1949,
853.
- (173) F. H. CARR et E. PRICE,
Biochem. J., 20, 1926, 497.
- (174) M. J. THOMPSON, W. E. ROBBINS, et G. L. BAKER,
Steroids, 2, 1963, 505.
- (175) C. F. GARBERS, H. SCHMID et P. KARRER,
Helv. Chim. Acta., 37, 1954, 1336.
- (176) V. R. VILLANUEVA, M. BARBIER, E. LEDERER,
Bull. Soc. Chim., 6, 1964, 1423.

- (177) K. F. SCHMIDT,
Ber., 37, 1924, 704 ; E. F. PHARES,
Arch. Biochem., 33, 1951, 173.
- (178) I. M. HEILBRON, R. F. PHIPERS, et H. R. WRIGHT,
J. Chem. Soc., 1934, 1572.
- (179) H. B. Mc PHILLAMY,
J. Amer. Chem. Soc., 64, 1942, 1732.
- (180) F. H. HEY, J. HONEYMAN, et W. J. PEAL,
J. Chem. Soc., 1950, 2881.
- (181) K. SAKAI,
Chem. & Pharmaceutical Bull., 11, 1963, 752.
- (182) E. HEFTMANN,
Ann., Rev. Plant Physiol., 1963, 230.



EDITIONS AGEALP
8 RUE DANTE
- PARIS V -